

3012

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



## **Studium metabolismu**

# **3-aminobenzanthronu, redukčního metabolitu karcinogenního 3-nitrobenzanthronu**

*Diplomová práce*

Školitelka: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

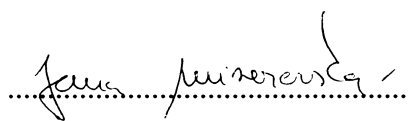
Praha 2006

Jana Mizerovská

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením školitele Doc. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 27.dubna 2006

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal dotted line. The signature is cursive and appears to read 'Jana Mizerovská'.

**Jana Mizerovská**

## **Poděkování**

Především bych velmi ráda poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání velmi zajímavého tématu diplomové práce, odborné vedení a laskavý a trpělivý přístup při vypracování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Heleně Dračínské, PhD. za odborné rady. Paní laborantce Ludmile Dvořákové za ochotu pomoci v průběhu řešení mé práce. Můj dík patří i všem ostatním členům naší laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

**OBSAH:**

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>7</b>
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
1. 1. KANCEROGENEZE .....	10
1. 1. 1. <i>Nádorová onemocnění, klasifikace nádorů</i> .....	10
1. 1. 2. <i>Mechanismus kancerogeneze</i> .....	11
1. 1. 3. <i>Karcinogenní faktory</i> .....	12
1. 2. BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK V ORGANISMU .....	13
1. 2. 1. <i>První fáze biotransformace: derivatizační fáze</i> .....	15
1. 2. 2. <i>Druhá fáze biotransformace: konjugací fáze</i> .....	16
1. 2. 2. 1. Typy konjugací reakcí .....	16
1. 3. MIKROSOMÁLNÍ MONOOXYGENASOVÝ SYSTÉM (MFO SYSTÉM).....	17
1. 3. 1. <i>Cytochrom P450</i> .....	18
1. 3. 1. 1. Struktura cytochromu P450 .....	19
1. 3. 1. 2. Spinové formy cytochromu P450 .....	19
1. 3. 1. 3. Názvosloví cytochromů P450.....	20
1. 3. 1. 4. Přehled vybraných podrodin cytochromů P450, jejich induktorů a substrátů .....	21
1. 3. 2. <i>Regulace hladiny cytochromů P450 jejich indukcí</i> .....	22
1. 3. 3. <i>Enzymové funkce cytochromu P450</i> .....	23
1. 3. 3. 1. Reakční mechanismus monooxygenasové reakce .....	24
1. 3. 4. <i>NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa</i> .....	26
1. 3. 4. 1. Struktura a funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy .....	27
1. 4. AROMATICKÉ AMINY .....	29
1. 4. 1. <i>Biotransformace aromatických aminů</i> .....	30
1. 5. 3-AMINO BENZANTHRON.....	32
1. 5. 1. <i>3-Nitrobenzanthron, prekurzor 3-ABA</i> .....	32
1. 5. 2. <i>Předpokládaná metabolická aktivace 3-ABA a 3-NBA</i> .....	33
<b>2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>36</b>
3. 1. POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	36

---

3. 2.	POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	37
3. 3.	METODY .....	38
3. 3. 1.	<i>Premedikace laboratorních potkanů (Stiborová M., ústní sdělení)</i>	38
3. 3. 2.	<i>Izolace subcelulární frakce z jaterní tkáně laboratorního potkana<sup>(102)</sup></i> .....	39
3. 3. 3.	<i>Stanovení obsahu cytochromu P450</i> .....	40
3. 3. 4.	<i>Stanovení koncentrace proteinu metodou dle Lowryho<sup>(113)</sup></i> .....	41
3. 3. 5.	<i>Studium oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana, obsahujícími cytochrom P450</i> .....	42
3. 3. 5. 1.	<i>Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana</i> ..	42
3. 3. 5. 2.	<i>Studium časové závislosti oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy</i> .....	43
3. 3. 5. 3.	<i>Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy v časovém intervalu do 30 minut inkubace</i> .....	43
3. 3. 5. 4.	<i>Kinetická studie oxidace 3-ABA mikrosomy potkana</i> .....	44
3. 3. 5. 5.	<i>Vliv pH na oxidaci 3-ABA pomocí jaterních mikrosomů potkanů indukovaných β-naftoflavonem, fenobarbitalem a kontrolního (neindukovaného) potkana</i> .....	44
3. 3. 5. 6.	<i>Příprava vzorků pro HPLC, podmínky separace a kvantifikace metabolitů 3-ABA HPLC</i> .....	44
3. 3. 5. 7.	<i>Příprava vzorků standardů 3-ABA a 3-NBA pro HPLC</i> .....	45
3. 3. 5. 8.	<i>Studium vazby 3-ABA po jeho aktivaci mikrosomálními systémy na proteiny</i> .....	45
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>47</b>
4. 1.	<b>STUDIUM OXIDACE 3-ABA MIKROSOMÁLNÍMI SYSTÉMY, OBSAHUJÍCÍMI CYTOCHROM P450, IZOLOVANÝMI Z JATER POTKANA</b> .....	<b>47</b>
4. 1. 1.	<i>Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného: β-naftoflavonem, fenobarbitalem a kontrolními mikrosomy neindukovaného potkana</i> .....	49
4. 1. 2.	<i>Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana v závislosti na době inkubace</i> .....	53

---

4. 1. 3. Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana v časovém intervalu do 30 minut inkubace.....	58
4. 1. 4. Kinetika oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana v závislosti na koncentraci 3-aminobenzanthronu .....	64
4. 1. 5. Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana v závislosti na změně pH .....	71
<b>5. DISKUSE.....</b>	<b>75</b>
<b>6. SHRNUÍ A ZÁVĚR .....</b>	<b>78</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>79</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	absorbance
3-ABA	3-aminobenzanthron
ACTH	adrenokortikotropní hormon
BSA	hovězí sérový albumin
c	koncentrace (koncentrace proteinu)
Co-A	koenzym A
COX1	cyklooxygenasa
CYP	cytochrom P450
cyt c	cytochrom c
Da	dalton
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DT-diaforasa	NADPH:chinon oxidoreduktasa
EC	číselný kód enzymu
EtOH	ethanol
FAD	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma)
(FADH, FADH <sub>2</sub> )	(semichinoidní radikál, hydrochinon)
FMN	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)
(FMNH, FMNH <sub>2</sub> )	(semichinoidní radikál, hydrochinon)
FMO	flavin obsahující monooxygenasa
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
HRP	křenová peroxidasa
IARC	mezinárodní institut pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
K <sub>m</sub>	Michealisova konstanta
K'	zdánlivá Michealisova konstanta
LPO	laktoperoxidasa
M	mol/l
M14, M18	metabolity 3-ABA
MFO	system monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxygenase)
MPO	myeloperoxidasa
MS	jaaterní mikrosomy potkana
n	Hillův koeficient
NADP <sup>+</sup> (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
NAT1,NAT2	N-acetyltransferasa 1,2
3-NBA	3-nitrobenzanthron

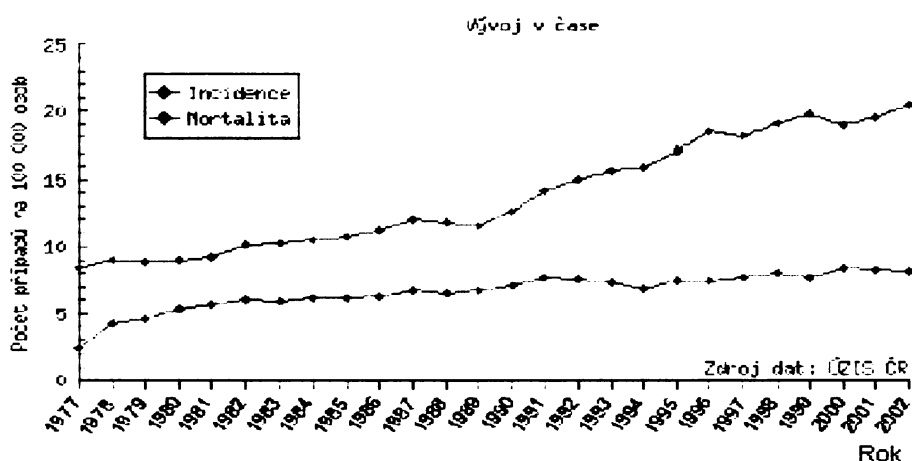
---

N-OH-ABA	N-hydroxylamin
P1-P3	pufř číslo 1 -3
P450	pigment s maximem absorbance při 450 nm (CYP)
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAPS	2'nebo 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PB	fenobarbital
PHO	prostaglandin H synthasa
RH	substrát
mRNA	informační ribonukleová kyselina (messenger ribonukleotid acid)
ROH	hydroxylovaný produkt
R*OOH	organický peroxid
RPM	počet otáček za minutu
SULT1, SULT2	sulfotransferasa 1,2
T <sub>3</sub>	trijodthyronin
TRIS	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	uridinfosfát
UV	ultrafialové záření
V <sub>max</sub>	maximální rychlost reakce
v <sub>o</sub>	počáteční rychlost reakce
w/v	hmotnost/objem
β-NF	β-naftoflavon
ε	molární absorpční koeficient
λ	vlnová délka



# 1. ÚVOD

V současné době postihují nádorová onemocnění stále větší počet jedinců. V České republice onemocní v průběhu života některým z mnoha druhů nádorových onemocnění bezmála každý třetí občan a každý čtvrtý na rakovinu zemře. Nádorové onemocnění se bohužel posunulo na přední místo z hlediska příčiny úmrtí<sup>(1, 3)</sup>. Nejen, že jsou nádorová onemocnění stále četnější, ale postihují daleko více jedinců v nižší věkové hranici<sup>(2)</sup>. Pro ilustraci je na následujícím obrázku uveden časový vývoj počtu nových případů nádorů močového měchýře na 100 000 osob a počet úmrtí na nádory močového měchýře na 100 000 osob v celé populaci ČR.



**Obr. 1** Vznik nádorů močového měchýře a mortality v čase v ČR<sup>(5)</sup>

Většinou se o nádorech neuvažuje jako o dědičném onemocnění. Je však známé, že asi 10 % nádorů může vzniknout na genetickém podkladě. Ročně je v České republice diagnostikováno přes 4,5 tisíce žen s nádorem prsu a přes 6 tisíc nemocných s nádorem tlustého střeva<sup>(5)</sup>. Až 10 % z nich může mít dědičnou povahu. Riziko vzniku nádoru je u nositelů geneticky podmíněných poruch mnohonásobně vyšší než u běžné populace<sup>(1, 6)</sup>.

Ke vzniku nádorového onemocnění přispívá řada faktorů, souvisejících s dnešním způsobem života. V první řadě je to nevhodná strava, obsahující zvýšené procento tuků a cukrů, dále nejrůznější aditiva a způsob úpravy potravin (např. pyrolytické procesy probíhající v mase při vysokoteplotních procesech, produkující tvorbu karcinogenních sloučenin)<sup>(3)</sup>. Dalším velmi důležitým vlivem, podporujícím vznik nádorového

onemocnění, je kouření. Významné místo při znečištění prostředí náleží nejen automobilové dopravě, která v naší republice stále více stoupá, ale i zplodinám pocházejícím z průmyslových provozů, spaloven a tepelných elektráren. Nesmíme opomenout ani dnes velmi často jmenovaný faktor, který také patří do skupiny vlivů vyvolávajících vznik rakovinotvorného onemocnění, a to stres.

## 1.1 Kancerogeneze

Kancerogeneze je proces, při kterém v organismu dochází k transformaci normální, zdravé buňky v buňku nádorovou. Následně dochází k nekontrolovanému dělení a růstu těchto iniciovaných buněk v patologický útvar, tedy nádor (tumor)<sup>(1,7)</sup>.

Molekulární příčinou vzniku rakovinotvorného onemocnění je mutace v jaderné DNA<sup>(4)</sup>. Mutace může být způsobena vnitřními faktory (spontánní mutace při replikaci). Nebo vnějšími faktory, mezi ně patří biologické vlivy (zastoupené viry a genetickými předpoklady), dále fyzikální faktory (např. radioaktivní a UV záření) a chemické vlivy<sup>(10)</sup>. Tato změna na úrovni genetické informace zapříčiní odklon buňky od kontrolních a regulačních mechanismů buněčného růstu.

### 1.1.1 Nádorová onemocnění, klasifikace nádorů

Nádory lze řadit dle několika kritérií. Jedním z hlavních kritérií je původ tkáně z které nádor vznikl (*Tab. 1, str. 11*). Dalším hlediskem je rozdělení podle schopnosti nádoru pronikat do jiné tkáně a proliferovat v ní za tvorby nového nádoru. Dle této schopnosti, tedy schopnosti metastazovat, jsou nádory označovány za benigní a maligní<sup>(1, 10)</sup>.

- ◆ **Benigní nádory** (nezhoubné): tyto nádory jsou dobře ohraničeny a tudíž i snáze odstranitelné chirurgickým zákrokem, nepronikají do jiné tkáně.
- ◆ **Maligní nádory** (zhoubné): tyto nádory mají schopnost pronikat do jiných tkání za tvorby dalších sekundárních nádorů.

Rakovinotvorné buňky mohou vzniknout v jakékoli tkáni či orgánu. Nejvíce četnou skupinou jsou nádory vzniklé z epitelálních tkání, přes 90 % případů rakoviny. Nejčastěji bývají zasaženy plíce, kůže a střeva<sup>(8)</sup>.

**Tabulka 1: Histogenetická klasifikace nádorů<sup>(8, 9)</sup>**

NORMÁLNÍ TKÁŇ		BENIGNÍ TUMOR	MALIGNÍ TUMOR
<b>EPITEL</b>	<i>Povrchový Žlázový</i>	Papilom Adenom	Karcinom Adenokarcinom
<b>SVAL</b>	<i>Kosterní Hladký</i>	Rhabdomyom Leiomyom	Rhabdomyosarkom Leiomyosarkom
<b>CHRUPAVKA</b>		Chondrom	Chondrosarkom
<b>KOLAGENNÍ POJIVO</b>		Fibrom	Fibrosarkom
<b>KOSTNÍ TKÁŇ</b>		Osteom	Osteosarkom
<b>JATERNÍ TKÁŇ</b>		Hepatom	Hepatocelulární karcinom
<b>TUKOVÁ TKÁŇ</b>		Lipom	Liposarkom
<b>NERVSTVO</b>	<i>Centrální Periferní</i>	Gliom Ganglioneurom	Glioblastom Neuroblastom

### 1. 1. 2 Mechanismus kancerogeneze

Nádor velmi často vzniká mutacemi protoonkogenů. **Protoonkogen** je strukturální gen, kódující protein, který se funkčně podílí na regulaci dělení buněk a jejich diferenciaci. Jeho přítomnost v normální buňce je jednou z hlavních podmínek normálního růstu, dělení a regulované diferenciaci. Změna, mutace v protoonkogenu, se projeví ztrátou těchto funkcí. Protoonkogen se aktivuje na onkogen, který vyvolává neoplastickou transformaci buňky<sup>(8)</sup>.

Na regulaci buněčného cyklu se kromě protoonkoproteinů podílí také **tumor supresorové geny** (antionkogeny). Produkty tumor supresorových genů potlačují proliferaci normálních somatických buněk a udržují je v klidovém stadiu. Změna v těchto důležitých genech, protoonkogenech a tumor supresorových genech, vede ke vzniku mutací a tudíž k maligní transformaci zdravé buňky<sup>(1, 10)</sup>.

Proces kancerogeneze je velmi složitý, multifázový proces, lze jej rozdělit do třech fází: iniciace, promoce a progresse<sup>(10)</sup>.

#### ◆ INICIACE

Během iniciace dochází ke změně genetické informace v normální buňce, která vede ke vzniku modifikace v DNA. Mutace může být rozpoznána a opravena.

### ◆ **PROMOCE**

V této fázi dochází k ještě větší proliferaci primárně pozměněných buněk, pod vlivem látek – promotorů. Většina z nich má pouze epigenetické vlastnosti, jejich účinky se proto mohou projevit až po působení genotoxických iniciátorů. Velká část promotorů je tkáňově specifická (např. forbolester - specifický promotor pro vývoj nádorů kůže)<sup>(10)</sup>. Promotory snadno reagují s enzymy, které katalyzují jednoelektronové oxidace. Produktem těchto reakcí jsou radikály promotorů, které se často podílejí na vzniku aktivních forem kyslíku. Aktivní formy kyslíku mohou vyvolat oxidativní změny v DNA a tak aktivovat protoonkogen<sup>(10)</sup>. Tato fáze může trvat léta až desetiletí. I toto stádium je ještě reverzibilní, při odstranění promočního činitele, je možné zastavit expanzi v nádorový útvar<sup>(1)</sup>.

### ◆ **PROGRESE**

Poslední fáze kancerogeneze je označována jako progrese. Látky, které v této fázi působí, jsou označovány za progresory. Dochází ke změně doposud alespoň částečně kontrolovaného růstu benigního nádoru na růst nekontrolovaný. Vzniká maligní nádor. Z něj pak mohou buňky cestovat krevním řečištěm, či mízními cestami na jiné místo organismu, kde tak vznikají metastáze<sup>(10)</sup>. Růst nádoru je doprovázen také angiogenezí v nádorové tkáni, kdy dochází ke vzniku a růstu více cév v oblasti nádoru. Za angiogenezi jsou odpovědné vaskulární endoteliální růstové faktory<sup>(1)</sup>.

### ◆ Výrazné vlastnosti nádorové buňky:

Nádorová buňka se dokáže vyhnout apoptóze, může se neomezeně dělit (je imortalizovaná), sama si vytváří potřebné růstové faktory, je necitlivá na inhibitory růstu, má zvýšenou rychlost buněčného dělení, má změněnou schopnost diferenciaci, neschopnost kontaktní inhibice, schopnost napadnout sousední tkáň, schopnost budovat metastáze ve vzdálených místech, má schopnost podpořit růst cév (angiogeneze)<sup>(1)</sup>.

## 1. 1. 3 **Karcinogenní faktory**

Faktory, které se podílejí na vzniku nádorových onemocnění, lze rozdělit podle jejich povahy do následujících skupin:

### ◆ **Biologické faktory**

K biologickým faktorům řadíme genetické předpoklady a některé viry<sup>(10)</sup>.

---

◆ **Fyzikální faktory**

Jsou zastoupeny ionizujícím zářením, UV zářením. Dále mechanickými vlivy, způsobenými velmi jemnými pevnými částicemi (azbest).

◆ **Chemické faktory (karcinogeny)**

Chemickým karcinogenům je v současné době věnována stále větší pozornost. Již přes 50 látek bylo organizací IARC označeno za prokazatelné karcinogeny<sup>(10)</sup>. Podle mechanismu jejich působení lze chemické karcinogeny rozdělit na:

**genotoxické karcinogeny**, které se váží kovalentní vazbou na DNA za tvorby aduktů

**epigenetické karcinogeny**, které modifikují DNA nekovalentní vazbou, např. interkalací (vmezeřením) do její dvoušroubovicové struktury

**karcinogeny způsobující změny struktury molekul DNA**, které poškozují strukturu DNA jedno- a dvouřetězovými zlomy (single and double-strand break), nebo může dojít ke změně struktury DNA bifunkčními činidly, které způsobují tzv. cross-linking (propojení molekul)<sup>(10)</sup>.

## 1.2 Biotransformace xenobiotik v organismu

Způsob přeměny a odstraňování nízkomolekulárních i vysokomolekulárních cizorodých látek (xenobiotik) z organismu se uskutečňuje mechanismy označovanými jako **biotransformace**<sup>(11)</sup>. Většina xenobiotik patří mezi organické látky hydrofóbní charakteru, které procházejí membránami a mohou se v organismu hromadit. Vyloučení xenobiotik z těla je možné, až po jejich metabolické přeměně na polárnější metabolity, což je hlavním cílem biotransformace<sup>(12)</sup>.

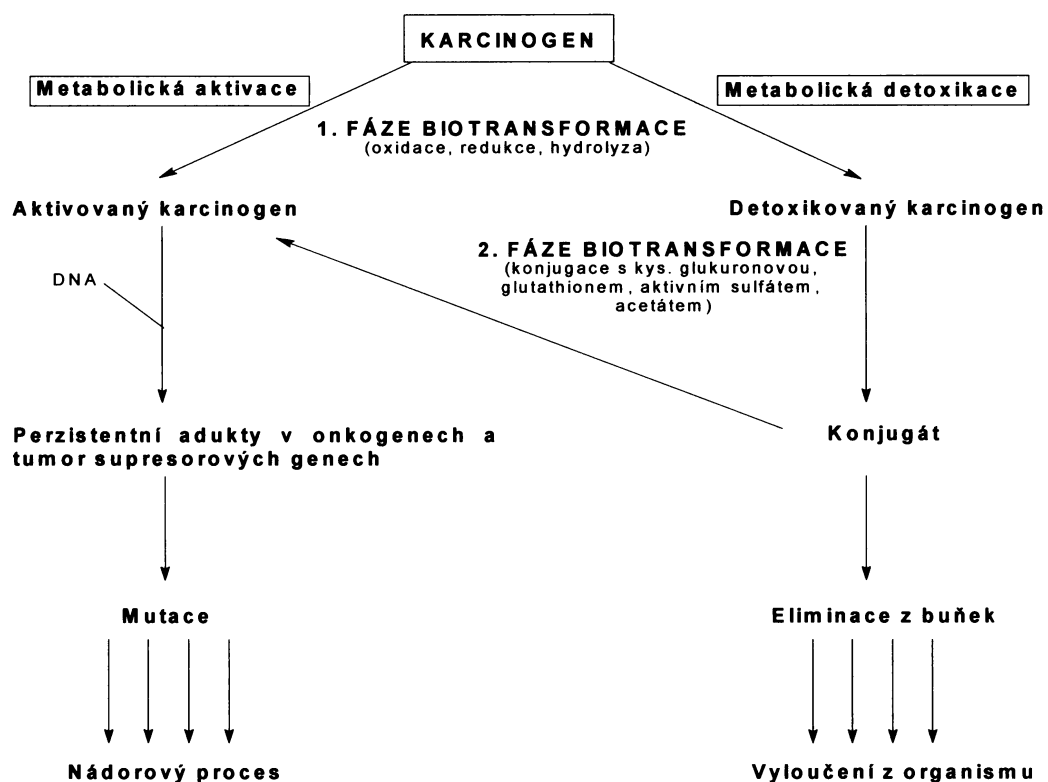
Hydrofilnější metabolity xenobiotik nemusí být jen netoxické, biologicky inertní látky, ale v závislosti na chemické struktuře daného xenobiotika a na enzymovém systému, který ho v organismu přeměňuje, se může naopak jednat o látky značného biologického významu. Místo, aby došlo k detoxikaci dané látky, dochází k její aktivaci. Metabolickou aktivaci tohoto typu vyžaduje řada léčiv, ale aktivováno je také 98 % genotoxických kancerogenů<sup>(13, 14)</sup>. O působení karcinogenů je známo, že řada z nich - tzv. proximálních

karcinogenů - musí projít biologickou aktivací. Zatímco jen malé procento z nich je okamžitým karcinogenem - tzv. ultimálním<sup>(3)</sup>.

Tyto dva procesy, detoxikaci a aktivaci, nelze od sebe vzájemně oddělit. Týž enzym se může účastnit např. v detoxikaci jedné chemické látky a přitom zvyšovat toxicitu látky druhé. Velice složité vztahy rovnováhy existují mezi oběma směry metabolismů, aktivačním a detoxikačním. Rovnováha mezi nimi může být posunuta oboustranně, a to důsledkem působení vnějších i vnitřních faktorů<sup>(15)</sup>. Schéma metabolické aktivace a detoxikace karcinogenu je zobrazeno na obrázku 2, str. 15.

Proces biotransformace xenobiotik u různých organismů není totožný. Průběh a stupeň její intenzity je ovlivněn řadou různých faktorů. Jednak vlastnostmi a strukturou samotné cizorodé látky. Biotransformaci také ovlivňuje organismus, do kterého bylo xenobiotikum vpraveno, např. biologický druh, dieta, způsob aplikace a další. Odchylky v biotransformaci se projevují rovněž i v rámci jednoho biologického druhu, a to v závislosti na pohlaví, věku, individuální enzymové aktivitě, geneticky podmíněné variabilitě nebo farmakologicky navozené aktivitě enzymových systémů<sup>(16)</sup>. Většina enzymů, které biotransformují cizorodé látky, je lokalizována v membráně endoplazmatického retikula<sup>(12, 17)</sup> např. MFO, prostaglandin H synthasa. Další biotransformační enzymy se ale také vyskytují volně v cytoplazmě (patří sem např. DT-diaforasa, xanthinoxidasa, některé peroxidasy<sup>(18)</sup>), dále se vyskytují v Golgiho aparátu nebo i v extracelulárním prostoru –laktoperoxidasa v mléce<sup>(18)</sup>.

U živočichů je proces biotransformace xenobiotik rozdělen do dvou fází<sup>(19)</sup>. První fází je fáze derivatizační a dochází při ní ke zvýšení polarity, reakcemi oxidačními, ale i reakcemi redukčními. Redukční reakce jsou důležité především pro nitro-, azo- a chinoidní sloučeniny. Druhou fází je fáze konjugační, při které dochází ke konjugaci těchto polarizovaných molekul s endogenními látkami (např. s kyselinou glukuronovou, glycinem, taurinem, aktivním sulfátem, glutathionem, cysteinem, aktivním acetátem atd.)<sup>(20, 31)</sup>.



Obr. 2 Metabolická aktivace a detoxikace karcinogenu<sup>(32)</sup>

### 1. 2. 1 První fáze biotransformace: derivatizační fáze

V této fázi biotransformace je zvyšována polarita xenobiotika zabudováním funkčních skupin do jeho molekuly nebo k demaskování těch funkčních skupin, které jsou v molekule již přítomny<sup>(21)</sup>.

*Rozeznáváme tři typy derivatizačních reakcí:*

**oxidace** (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, epoxidace, oxidace alkoholů, aldehydů a podobně)

**hydrolýza** (hydrolýzou esterů, amidů)

**redukce** (nitro- a azoredukce), mezi kancerogeny aktivované redukční cestou patří např. 2-nitroanisol<sup>(22)</sup>, 3-NBA, 1-nitropyren<sup>(23)</sup>, 1,6-nitropyren<sup>(24)</sup> či aristolochové kyseliny<sup>(25, 26)</sup>

Nejdůležitějším enzymovým systémem, který se podílí na I. fázi biotransformace, je mikrosomální systém **monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO)** s **cytochromem P450** jako **terminální oxidasou (kapitola 1.3.1)**, který katalyzuje většinu oxidačních reakcí. Dalšími enzymovými systémy, které se podílejí na derivatizační fázi, jsou

**DT-diaforasa, hemové peroxidasy, alkoholdehydrogenasy, aldehyddehydrogenasy a reduktasy** (cytosolární xanthinoxidasa)<sup>(27)</sup>.

**Zieglerův enzym**, mikrosomální monooxygenasa obsahující flavin (FMO), se taktéž podílí na I. fázi biotransformace. Je také zabudován do membrány endoplazmatického retikula, jeho substráty jsou NADPH a O<sub>2</sub>, prosthetickou skupinou je FAD. Tento enzym metabolizuje především terciární aminy na N-oxidy, sekundární aminy na N-hydroxyderiváty a sloučeniny s obsahem síry<sup>(28)</sup>.

### 1. 2. 2 Druhá fáze biotransformace: konjugační fáze

V druhé fázi biotransformace dochází k vazbě malých endogenních molekul na reaktivní skupiny xenobiotik, vytvořených v derivatizační fázi. Tato vazba ještě zvýší polaritu původně hydrofobní molekuly a více se tím usnadní její vyloučení z organismu. K exkreci vzniklých konjugátů nejčastěji dochází močí a žlučí<sup>(29, 30)</sup>.

#### 1. 2. 2. 1 Typy konjugačních reakcí

V konjugační fázi biotransformace však může také dojít i k aktivaci xenobiotika na toxicitější sloučeninu. Je tomu tak např. u konjugátů s **aktivním sulfátem**, které vznikají z N-hydroxylovaných aromatických aminů účinkem **sulfotransferas** (sulfát musí být pro konjugační reakci nejprve aktivován na 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát-PAPS). Konjugát sulfátu s N-hydroxylsloučeninami (z první fáze biotransformace) je v kyselém prostředí močových cest nestabilní a rozpadá se za vzniku nitréniového (event. karbeniového) iontu<sup>(20)</sup>, vzniká tak elektrofil, který je schopen reagovat s DNA a proteiny. Sekundární dekonjugace může nastat i účinkem enzymových systémů, přítomných ve střevní mikroflóře<sup>(15)</sup>.

Vznik konjugátů s **kyselinou glukuronovou** patří mezi nejtypičtější konjugáty u živočichů. Konjugáty jsou tvořeny za katalýzy **UDP-glukuronosyltransferasy**. Vzniklé konjugáty mají zejména detoxikační význam (O- nebo N-glukosiduronáty) a jsou vylučovány především močí<sup>(20, 29)</sup>.

Konjugáty s **glutathionem** řadíme také do výrazné skupiny antikancerogenních procesů. Tvorbu těchto konjugátů katalyzuje **glutathion-S-transferasa**, která je schopna vázat reaktivní metabolity a katalyzovat jejich vazbu s glutathionem<sup>(15, 20)</sup>. Tento konjugát ještě není finální sloučeninou, která je vylučována, ale dochází k odštěpení



$\gamma$ -glutamylového zbytku v ledvinách a glycylového v játrech za katalýzy peptidas. Cysteylový zbytek je dále upravován acetylací (katalyzovanou acetyltransferasami) za vzniku merkapturové kyseliny, která již může být vyloučena močí. Glutathion je považován za “scavenger” (vychytávač) cizorodých látek<sup>(31)</sup>.

Konjugáty s aminokyselinami (cystein, glycin, taurin, glutamin) mají rovněž detoxikační význam, a jsou vylučovány výkaly.

### 1.3 Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém)

Mikrosomální monooxygenasový systém je soubor enzymů, které katalyzují celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík<sup>(33)</sup>. Je též označován jako systém oxidas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases = MFO systém). Je lokalizovaný na vnější straně endoplazmatického retikula, popřípadě mitochondrií (*Obr. 3, str. 18*). Obsahuje tři základní složky:

- 1) hemthiolátový enzym **cytochrom P450**, který slouží jako terminální oxidasa
- 2) flavoproteinový enzym **NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa**, která slouží jako dělič elektronového páru
- 3) nedílnou součástí je **membrána endoplazmatického retikula**.

Membránové lipidy způsobují změny cytochromu P450 v jeho konformaci, a tím zvyšují jeho afinitu k substrátu, stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu cytochrom P450 - NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa a jsou také „zásobárnou“ uložených substrátů cytochromu P450<sup>(34)</sup>. MFO systém může také fakultativně obsahovat cytochrom  $b_5$  a NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasu (EC 1.6.2.2)<sup>(31)</sup>.

#### **Lokalizace MFO systému:**

- **Na vnější (cytosolární) straně membrány hladkého i hrubého endoplazmatického retikula** v orgánech exponovaných látkami cizorodé povahy (játra, plíce, ledviny, GIT, kůže a mozek). Zde se MFO systém účastní první fáze biotransformace xenobiotik.

- Na **mitochondriální membráně**, jak je tomu především v kůře nadledvin, kde se podílí na metabolismu endogenních látek (například steroidů a mastných kyselin).



*Obr. 3 Lokalizace MFO v eukaryotické buňce, převzato z<sup>(35)</sup>*

### 1. 3. 1 Cytochrom P450

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) je terminální oxidasou MFO systému. Zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu<sup>(36)</sup>, přičemž druhý atom kyslíku redukuje na vodu<sup>(37)</sup>. Elektrony, které jsou k redukci potřeba, dodává NADPH:cytochrom P450 reduktasa<sup>(38)</sup>, případně NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa<sup>(39)</sup>.

V roce 1958 Garfinkel a Klingenberg objevili v jaterních mikrosomech pigment, který po redukci vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450 nm<sup>(40, 41)</sup>. Hemoproteinový charakter pigmentu dokázali Omura a Sato roku 1964 a na základě podobnosti povahy vazby hemu cytochromům b a podle netypického maxima Soretova pásu, jej nazvali cytochromem P450<sup>(42)</sup>.

Z evolučního hlediska je cytochrom P450 považován za velmi starý hemoprotein, který se objevil mnohem dříve než hemoglobin<sup>(43, 44)</sup>. Je příkladem enzymu, který se vyvíjel cestou divergentní evoluce. Z jediného genu cytochromu P450 archebakterií se do současnosti vyvinulo ohromné množství odlišných genů, kódujících cytochromy prokaryotních i eukaryotních organismů<sup>(45)</sup>. Systém cytochromu P450 je v eukaryotických buňkách vázán v membráně endoplazmatického retikula nebo mitochondrií prostřednictvím transmembránového N-terminálního  $\alpha$ -helixu<sup>(46)</sup>, zatímco bakteriální cytochromy P450 jsou enzymy rozpustné. I přes značné rozdíly v substrátové specifitě a

struktře, všechny obsahují konzervované sekvence oblastí v blízkosti vazebného místa pro hem.

### 1. 3. 1. 1 Struktura cytochromu P450

Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v proteinové molekule enzymu vázán hydrofobními silami, a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulphydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu (pátý ligand železa protoporfyrinu IX)<sup>(47, 48)</sup>. Nejedná se tedy o klasický cytochrom (protoporfyrin IX vázán prostřednictvím imidazolového zbytku histidinu), ale o **hemthiolátový protein**. Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje je od hemoproteinů ostatních. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody<sup>(50)</sup>.



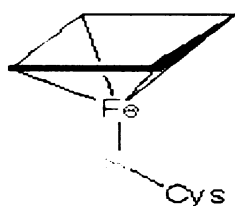
*Obr. 4 Struktura cytochromu P450 2B4 (králík)<sup>(49)</sup>*

Proteinovou část CYP (apoprotein) tvoří 490-520 aminokyselin a je možno na ní rozlišit domény pro vazbu hemu, reduktasy a substrátu.

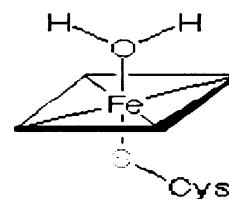
### 1. 3. 1. 2 Spinové formy cytochromu P450

Cytochromy P450 existují ve dvou spinových formách, díky přechodnému charakteru hemového železa<sup>(34)</sup>.

- ✦ **Vysokospinová forma cytochromu P450:** tato forma vzniká v případě, že ion železa je v pentakoordinovaném stavu a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované (spin 5/2). Ion železa je „vytažen“ thiolátovou skupinou nad rovinu porfyrinového skeletu. Tato forma vykazuje maximum Soretova pásu při 390 nm.



*Obr. 5 A) Vysokospinová forma*



*B) Nízko-spinová forma převzato z<sup>(52)</sup>*

- ♦ **Nízkospinová forma cytochromu P450** (spin 1/2) je charakteristická maximem absorpce při 418 nm (Soretův pás). Ion železa je v hexakoordinovaném stavu, hemové železo tedy interaguje ještě s jedním ligandem (například s –OH, –COOH nebo s –NH<sub>2</sub> skupinou postranních řetězců aminokyselin apoproteinu<sup>(34)</sup> či atomem kyslíku z molekuly vody<sup>(50)</sup>) a nachází se pak prakticky v rovině kruhu protoporfyrinu IX.

V klidovém stavu jsou oba spinové stavy v rovnováze. Značná změna jejich poměru ve prospěch vysokospinové formy nastane při vazbě substrátu do vazebného místa, kdy dochází k vytlačení šestého ligandu a nárůstu vysokospinové formy. V absorpčním spektru je tedy patrný nárůst absorbance při 390 nm a pokles při 418 nm – tzv. „substrátové spektrum“.

Šestým ligandem železa se však může stát i samotný substrát (či nepřeměňovaná látka vázající se do aktivního centra enzymu), pak registrujeme pokles absorbance při 390 nm a nárůst (podle heteroatomu) při 418 až 460 nm, tedy tzv. „ligandové spektrum“<sup>(53)</sup>.

### 1. 3. 1. 3 Názvosloví cytochromů P450

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (izoenzymech, izoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou CYP, následuje velké písmeno označující podrodinu<sup>(51)</sup> Jednotlivé izoenzymy jsou pak určeny číslem za písmenem podrodiny<sup>(45)</sup> (např. CYP3A4).

Do stejné rodiny náleží cytochromy P450, u kterých byla nalezena více než 40% homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů. Do stejné podrodiny pak ty, které vykazují homologii více než 55%<sup>(54)</sup>. Současná nomenklatura byla navržena Nebertem a spolupracovníky<sup>(55)</sup>. V současnosti již bylo popsáno více jak 1000 izoenzymů cytochromu P450, které náleží do 74 rodin. V lidském organismu bylo dosud nalezeno 48 genů pro cytochromy P450, klasifikovaných do 18 rodin<sup>(56)</sup>. Metabolismu léčiv, respektive xenobiotik, se účastní převážně cytochromy P450 pouze tří z těchto rodin: **CYP1**, **CYP2** a **CYP3** (v menší míře též CYP4). Ostatní rodiny participují na biosyntéze steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin, na metabolismu mastných kyselin, kyseliny arachidonové apod.<sup>(56)</sup>.

### 1. 3. 1. 4 Přehled vybraných podrodin cytochromů P450, jejich induktorů a substrátů

Cytochromy P450, participující na biotransformaci xenobiotik, mají poměrně širokou substrátovou specifitu. Jsou známy podrodiny, které hydroxylují celou škálu organických sloučenin (např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), alifatické uhlovodíky, aromatické i alifatické aminy, polycyklické aromatické nitrosloučeniny, fenoly, dále pak řadu léčiv). Existují však ale i cytochromy P450, které hydroxylují pouze malý počet substrátů. Do této skupiny patří cytochromy P450, které metabolizují endogenní sloučeniny v eukaryotických buňkách (např. steroidní hormony)<sup>(45, 57)</sup>.

#### ◆ **Cytochrom P450 1A:**

U lidí je tato podrodina zastoupena dvěma členy, a to cytochromy P450 1A1 a 1A2. Oba zástupci jsou si dosti podobné, až 70% homologie v aminokyselinové sekvenci. **Cytochrom P450 1A1** je především extrahepatálním enzymem. *Vyskytuje se v následujících orgánech:* plíce, ledviny, kůže, GIT, placenta, lymfocyty. *Substrátem enzymu jsou:* polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), benzo-[a]-pyren, aminopyrin, tamoxifen, tabákově specifický nitrosamin [4]- (methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon, 7-ethoxykumarin, aflatoxin. *Induktorem enzymu jsou:* β-naftoflavon, fenothiazin, benzo-[a]-pyren, 2-acetaminofluor, kouření a další látky<sup>(45)</sup>.

#### ◆ **Cytochrom P450 1A2**

*Vyskytuje se především v játrech*, tvoří asi 13% celkového jaterního cytochromu P450. V menší míře se vyskytuje v plicích. *Substrátem enzymu jsou především* tamoxifen, fenacetin, theofylin, paracetamol, kofein, theofylin, aromatické a heterocyklické aminy vznikající při vysokoteplotních úpravách masa. *Induktorem enzymu jsou* látky stejné jako u cytochromu P450 1A1, tedy β-naftoflavon, benzo-[a]-pyren atd<sup>(45, 58, 59, 61, 62)</sup>.

#### ◆ **Cytochrom P450 2B**

Lidský cytochrom P450 2B6 je zastoupen hlavně v játrech a plicích (1 % celkového jaterního cytochromu P450), u potkanů jsou zastoupeny cytochromy P450 2B1 a 2B2, u králíka pak cytochrom P450 2B6. *Substrátem enzymu jsou především* nikotin,

7-ethoxykumarin, aflatoxiny, cyklofosfamid. **Induktorem enzymu jsou:** barbituráty (fenobarbital), dexamethazon<sup>(45)</sup>.

#### ◆ **Cytochrom P450 2C**

U lidí jsou cytochromy P450 2C zastoupeny nejvíce ve formě cytochromu P450 2C8 a 2C9, a to především v játrech, plicích, GIT, placentě. **Substrátem enzymů jsou především** léčiva s menší molekulou (diazepam, ibuprofen, retinol, diclofenac). Tyto cytochromy P450 jsou poměrně málo inducibilní, indukuje je fenobarbital. **Inhibítorem enzymu jsou:** sulfoamidy a chloramfenikol.

#### ◆ **Cytochrom P450 2E**

V játrech u lidí a potkanů je zastoupena izoforma 2E1, asi 7 % CYP, dále jsou tyto enzymy zastoupeny v ledvinách, nosní sliznici, plicích, GIT. **Substrátem enzymu jsou především** nízkomolekulární lipofilní látky jako je ethanol, kofein, aceton, benzen, chlorzoxazon, anilin, paracetamol, nitrosaminy. **Induktorem enzymu jsou:** toluen, aceton, ethanol, hladovění, pyridin<sup>(58, 59)</sup>.

#### ◆ **Cytochrom P450 3A**

Tato izoforma hraje u lidí významnou roli v metabolismu xenobiotik. Tvoří 28 % jaterního CYP. Dále je také přítomen v plicích a tenkém střevě. CYP 3A4 vykazuje extrémě širokou substrátovou specifitu. Metabolizuje látky steroidní povahy, kortisol, estradiol, erytromycin, cyklofosfamid, metadon, cyklosporiny. **Induktorem enzymu jsou:** barbituráty, rifampicin, steroidní látky, metadon.

### 1. 3. 2 Regulace hladiny cytochromů P450 jejich indukcí

Řada cytochromů P450 patří mezi inducibilní enzymy. Indukce enzymů je definována, jako nárůst exprese katalyticky aktivních forem enzymů, kdy dochází ke zvýšení transkripce na základě stimulace chemickým signálem<sup>(58)</sup>.

Indukce cytochromů P450 většinou zvyšuje biotransformaci xenobiotika, která by měla vést k jeho detoxikaci a k vyloučení z organismu. Jedná se tedy především o ochranný mechanismus. Některé cytochromy P450 však mohou nereaktivní sloučeninu přeměňovat na chemicky aktivní, toxické či karcinogenní intermediáty, v tomto případě se nejedná o detoxikaci, ale o aktivaci.

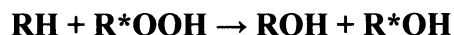
U léčiv, která jsou účinná bez metabolické aktivace, pak může indukce cytochromu P450 zvýšit jejich eliminaci a snížit tak farmakologický efekt. Pokud je léčivo induktorem a zároveň substrátem některé izoformy cytochromu P450, může stimulovat svoji detoxikaci, a to může vést až k toleranci organismu vůči danému léčivu. Naopak u léčiv vyžadujících metabolickou aktivaci může indukce cytochromu P450 vést ke zvýšení jejich farmakologického účinku<sup>(31,58)</sup>.

Regulace exprese cytochromů P450 je řízena několika systémy. Jedná se o regulaci exprese na genové úrovni, zahrnující funkci specifických receptorů, rychlost přepisu DNA do RNA, či stabilizaci syntetizované mRNA, a dále o posttranslační regulaci založenou především na stabilizaci molekuly proteinu daného cytochromu P450<sup>(60)</sup>.

### 1. 3. 3 Enzymové funkce cytochromu P450

- ◆ **Oxidasová funkce** - aktivace biatomické molekuly kyslíku pro klíčové reakce<sup>(63)</sup>. Spontánní reakce organických molekul s atmosférickým kyslíkem jsou spinově zakázané. Aerobní organismy proto obsahují řadu proteinů, nesoucích prosthetickou skupinu s kovem nebo flavinem, pomocí nichž jsou schopny využít oxidační potenciál kyslíku<sup>(63)</sup>.
- ◆ **Oxygenasová aktivita** - zabudování kyslíku do molekuly málo reaktivního substrátu.
- ◆ **Redukční reakce** - elektrony poskytnuté NADPH:cytochrom P450 reduktasou mohou redukovat přímo substrát a nejsou využity k aktivaci molekuly kyslíku. K této reakci dochází, pokud je hydrofobní substrát zároveň i dobrým ligandem železa porfyrinového skeletu, a je tedy vázán místo kyslíku, jako šestý ligand. Tento mechanismus je popsán *in vitro* a existují i nepřímé důkazy pro jeho průběh *in vivo*.

- ◆ **Peroxidasová aktivita** - místo kyslíku je druhým substrátem organický peroxid ( $R^*OOH$ ) nebo peroxid vodíku<sup>(64)</sup>. Pro průběh reakce není potřeba NADPH jako zdroj elektronů<sup>(65)</sup>. Produktem reakce je stejně, jako při klasickém mechanismu, hydroxylovaný substrát (ROH):

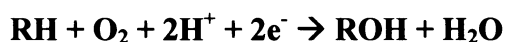


- ◆ **Produkce peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ) a aktivních forem kyslíku**

K výše zmíněnému jevu dochází pouze tehdy, když MFO systém interaguje s látkou, která se obtížně hydroxyluje (je pouze hydrofobní, tvoří komplex s enzymem, ale těžko se do ní zabudovává kyslík). Proběhne oxidasová fáze funkce cytochromu P450 (aktivuje se molekula kyslíku), ale už neproběhne fáze oxygenasová. Aktivní forma kyslíku je z molekuly uvolněna do okolí, kde přijme protony nebo dismutuje<sup>(31)</sup>.

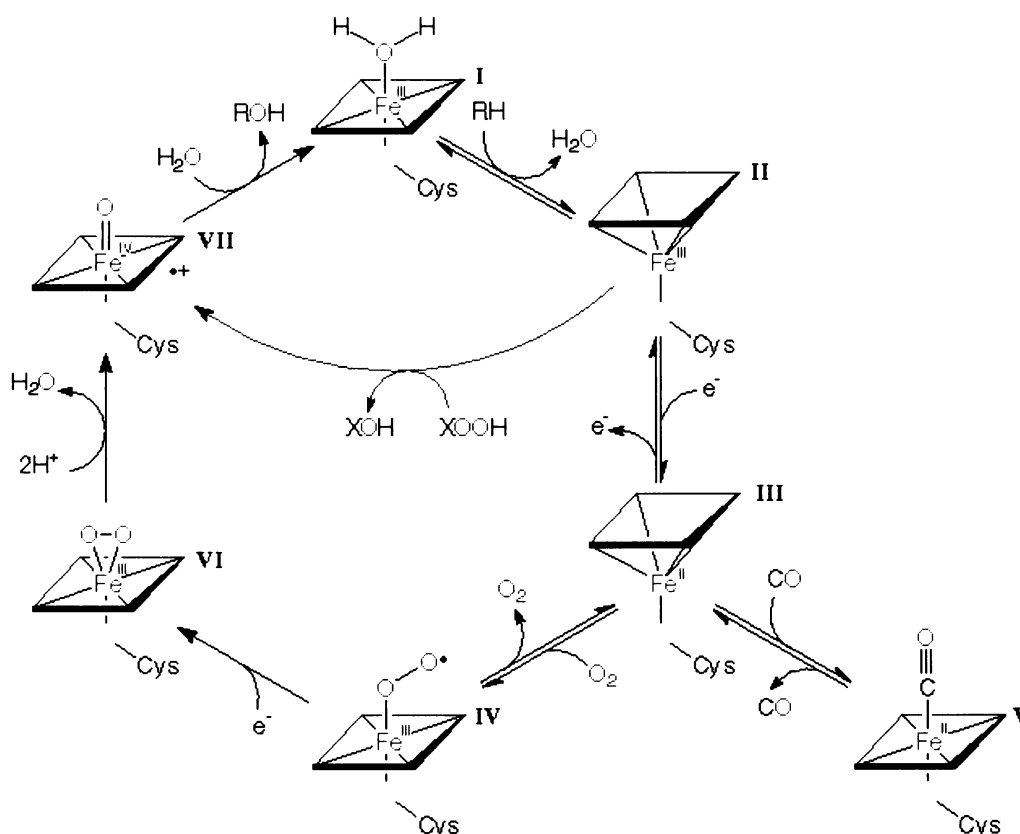
### 1. 3. 3. 1 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce

Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenasová reakce, která zahrnuje aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu do molekuly substrátu. Aktivace kyslíku je umožněna díky dvěma elektronům, pocházejícím z NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy, ale donorem druhého elektronu může být i NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasa<sup>(31)</sup>. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450, lze vyjádřit sumární rovnicí (kde RH značí substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce)<sup>(66)</sup>:



Reakční sled probíhá uspořádaným mechanismem a sestává alespoň z osmi kroků. Schematicky je znázorněn na obrázku 6, str. 25<sup>(21, 52)</sup>.





**Obr. 6** Schéma reakčního mechanismu monoxygenasové reakce. Je zde naznačena i peroxidasová aktivita cytochromu P450 a tvorba komplexu redukováného cytochromu P450 s oxidem uhelnatým. Bližší popis je uveden níže v textu<sup>(66)</sup>.

**I.** V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (tzn. s oxidačním číslem III) a je hexakoordinováno (nízko-spinový stav). Šestá valence je obsazena kyslíkem vody nebo interním (aminokyselinovým) ligandem.

**II.** Po vniknutí substrátu (RH) do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu iontu železa, které zůstane pentakoordinované (vysoko-spinový stav), a zároveň dochází ke konformační změně v molekule enzymu.

**III.** Vazbou substrátu je umožněna jednoelektronová redukce cytochromu P450 interakcí s NADPH:cytochrom P450 reduktasou, čímž se hemové železo redukuje na ferro formu, neboli  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , přičemž zůstává pentakoordinováno (vysoko-spinový stav). Tato forma enzymu je pak schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy.

**IV.** Navázáním molekulárního kyslíku (III) se dále tvoří ternární ferri-superoxidový komplex, kde je železo opět hexakoordinované a tudíž v nízko-spinové stavu. Tento nepříliš

stabilní komplex je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion (Pokud není druhý elektron doručen dostatečně rychle, komplex (IV) se rozpadá a uvolněný **superoxidový anionradikál** je pak superoxiddismutasou přeměněn na peroxid vodíku, který je pro buňky toxický).

V. Vazba kyslíku na formu (III) může být inhibována v přítomnosti oxidu uhelnatého, který vytváří ternární ferrokomples **cytochrom P450-CO-RH**. (Fe<sup>II</sup>).

VI. Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukci je již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází k heterolytickému štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody. Zatímco druhý zůstane vázán na Fe hemu a vzniká tak ferrioxenový komplex.

VII. Ten je stabilizován mesomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Takto vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu, za vzniku radikálu substrátu, a hydroxylovaného radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu substrátu (ROH), který je z enzymu uvolněn<sup>(66)</sup>.

V přítomnosti oxidačních činidel, jako jsou organické peroxidy, může z komplexu (III) vznikat přímo stav (VII) (peroxidasová aktivita).

#### 1. 3. 4 NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa

Enzym NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (EC 1.6.2.4) je membránově vázaný „žlutý protein“, který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450<sup>(67)</sup> (v daném organismu je jedna forma NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy, která má schopnost spolupracovat s více formami cytochromu P450). Přenos elektronů byl popsán také na cytochrom c, cytochrom b<sub>5</sub>, hem oxygenasu, ferrikyanid, elongasu mastných kyselin a další<sup>(34)</sup>. NADPH:cytochrom P450 reduktasa může být za určitých okolností zastoupena NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou, které jako donor vodíku slouží NADH.

### 1. 3. 4. 1 Struktura a funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy

NADPH:cytochrom P450 reduktasa má dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální (6 kDa), kterou je zakotvena v membráně<sup>(68)</sup>, a hydrofilní C-terminální katalytickou doménu (72 kDa)<sup>(66, 69)</sup>.



*Obr. 7 Struktura NADPH: cytochrom P450 reduktasy<sup>(49)</sup>*

C-terminální funkční doména se skládá z FMN- a FAD- vazebné strukturní domény. „Spojovací“ struktura umístěná mezi FMN- a FAD- vazebnou doménou pak zodpovídá za správnou prostorovou orientaci obou strukturních domén. FAD a FMN skupiny se vzájemně nepřekrývají, jsou v kontaktu prostřednictvím 7- a 8- methylových skupin isoalloxazinových kruhů, které leží těsně u sebe a svírají úhel zhruba 150°. Přenos elektronů mezi flaviny je tedy patrně přímý, není zprostředkovaný zbytkem aminokyseliny, a proto je tento přenos poměrně rychlý<sup>(69)</sup>.

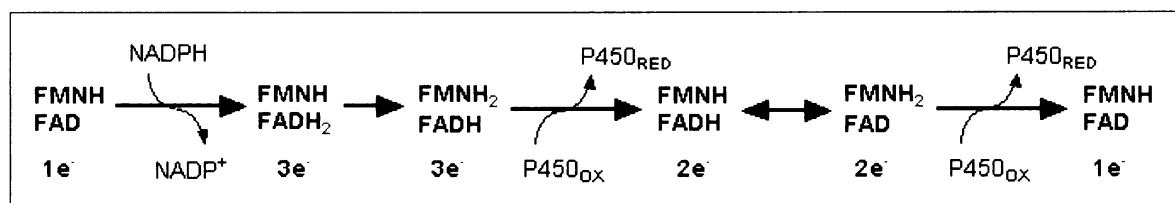
**FAD-vazebná doména** je zodpovědná za (nekovalentní) vazbu NADPH; pozitivně nabitě aminokyseliny (arginin, lysin) v místě vazby NADPH interagují s negativně nabitou fosfátovou skupinou v poloze 2' ribosy, kterou se tento koenzym liší od NADH a způsobují tak neobvykle vysokou selektivitu NADPH:cytochrom P450 reduktasy vůči NADPH<sup>(69)</sup>.

**FMN-vazebná doména** je zodpovědná za přenos elektronů na akceptorovou molekulu (cytochrom P450, cytochrom c). Pyrimidinová strana isoalloxazinového kruhu FMN se nachází blízko povrchu enzymu a je tak pro akceptorovou molekulu snadno dostupná.

Interakce mezi NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem P450 jsou hlavně elektrostatické povahy. Kladně nabitý povrch cytochromu P450 (lysiny, argininy) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:cytochrom P450 reduktasy (aspartát, glutamát). Dále se také uplatňují interakce hydrofobní, a to mezi nepolárními

aminokyselinami (leucin, tryptofan, valín) v oblasti membránových domén NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu P450<sup>(69, 70, 71)</sup>.

Funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy, jako děliče elektronového páru byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů obou flavinových prosthetických skupin<sup>(72, 73)</sup>. Akceptorem elektronů (respektive atomů vodíku) od NADPH je FAD, který elektrony následně předává FMN. Za jednoelektronovou redukci akceptorové molekuly - cytochromu P450 - je (v případě savčí NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy) zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH<sub>2</sub><sup>(74)</sup>:



**Obr. 8** Schéma přenosu elektronů mezi flaviny NADPH:cytochrom P450 reduktasy<sup>(74)</sup>

Vzhledem k tomu, že NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa a cytochromy P450, jako složky MFO systému, spolu velmi úzce „spolupracují“ při biotransformaci xenobiotik i eobiotik, některé ze sloučenin majících schopnost indukovat cytochromy P450 indukují současně i NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu. Většinou však k indukci dochází v daleko menší míře. Zatím nebylo prokázáno, zda k indukci NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy dochází stejnými mechanismy (prostřednictvím stejných receptorů), jako při indukci cytochromu P450. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu indukují například 3,3',4,4'-tetrachlorbifenyl<sup>(75)</sup> progesteron<sup>(76)</sup> a některé dimethylsiloxany<sup>(77)</sup>. Dále byla zvýšená aktivita NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy stanovena v jaterních, ledvinných a plicních mikrosomech u potkanů, vystavených čtyřtýdenní inhalaci zplodin motorových vozidel<sup>(78)</sup>.

Aktivita NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy je regulována zejména hormonálně, především hormonem štítné žlázy trijodthyroninem (T<sub>3</sub>), který zasahuje do regulace exprese genu pro NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu na úrovni transkripce prostřednictvím responzivního elementu pro thyroidální hormony (TRE) v promotorové oblasti genu. V menší míře se uplatňuje též stabilizace mRNA<sup>(80)</sup>. Při absenci thyroidních hormonů v organismu dojde k poklesu aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

v jaterních mikrosomech o 75 až 85 %. Naproti tomu v ledvinných či plicních mikrosomech činí tento pokles 30 až 50%<sup>(80, 81)</sup>. V nadledvinách a jiných steroidogenních tkáních je hladina NADPH:cytochrom P450 reduktasy regulována adrenokortikotropním hormonem (ACTH)<sup>(82)</sup>.

V rámci fylogeneze je NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa velmi konzervovaný enzym. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy z různých rostlinných a živočišných druhů vykazují vysokou homologii v aminokyselinové sekvenci (například lidská a potkaní forma mají sekvenční homologii 92%), přičemž nejvíce odlišností v aminokyselinové sekvenci se vyskytuje v N-terminální „kotvící“ oblasti, zatímco FMN-vazebná doména je u obou forem téměř shodná<sup>(49)</sup>. Tento fakt ukazuje na významnou roli tohoto enzymu v průběhu evoluce<sup>(79)</sup>.

## 1.4 Aromatické aminy

Aromatické aminy jsou používány především v barvářském průmyslu, kde slouží jako intermediáty při výrobě barviv a pigmentů, a to hlavně při výrobě azobarviv<sup>(83)</sup>. Jejich použití v barvářském průmyslu se datuje od roku 1870, kdy bylo s touto výrobou započato v Německu, předtím byly všechny barvy a pigmenty přírodního původu<sup>(84)</sup>. Aromatické aminy jsou také významnou složkou cigaretového kouře. Heterocyklické aromatické aminy vznikají pyrolysou aminokyselin z proteinů při vysokoteplotních procesech, probíhajících při tepelné úpravě masa.

Aromatické aminy se využívají i v dalších průmyslových odvětvích, kterými jsou např.: textilní a kožedělný průmysl, zpracování gumy, plastů a ropy, tiskařský průmysl a farmaceutický průmysl (řada léčiv obsahuje aminoskupinu – lidokain, chloranilin je intermediátorem při výrobě léčiv)<sup>(84)</sup>. Pracovníci těchto zmíněných průmyslových odvětví jsou vystaveni poměrně velkému působení (expozici) aromatických aminů. Existuje korelace mezi vystavením těmto sloučeninám a vzniku nádorů močového měchýře a tlustého střeva. Především byla tato korelace zaznamenána u pracovníků již zmíněného barvářského a gumárenského průmyslu. Zde je riziko nádorového onemocnění 100 a více násobné<sup>(86)</sup>.

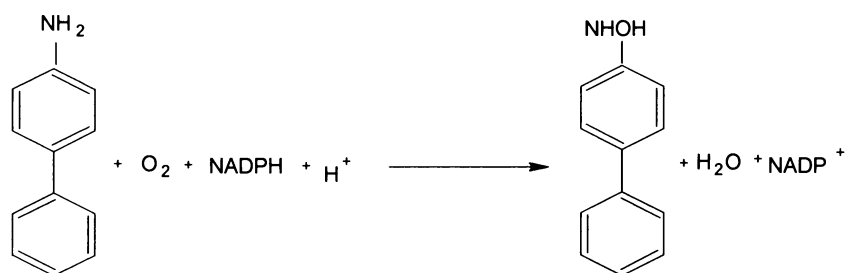
Endogenními zdroji aromatických aminů je serotonin, který je prekursorem melatoninu, další neurotransmitery a hormony<sup>(85)</sup>.

### 1. 4. 1 Biotransformace aromatických aminů

#### a) I. fáze biotransformace aromatických aminů

Detoxikační cesta aromatických aminů v organismu vede přes oxidaci atomů uhlíku na aromatickém jádře. Aktivační cesta je zprostředkována N-oxidací, při které vzniká proximální karcinogenní derivát<sup>(87)</sup>.

MFO systém obsahující **cytochrom P450**, je zodpovědný za N-oxidativní biotransformaci aromatických aminů játrech.

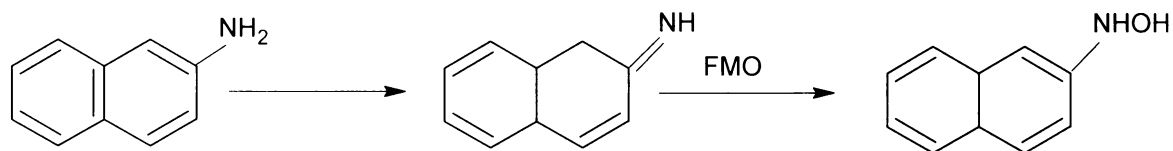


**Obr. 9** Příklad biotransformace 4-aminobifenylu<sup>(88)</sup>

Na přeměně aromatických aminů se cytochromy P450 podílejí různou měrou, a to jak podle izoformy daného cytochromu P450, tak dle struktury metabolizované sloučeniny.

Kromě oxidace cytochromy P450 se na I. fázi biotransformace podílejí i další enzymy, kterými jsou **peroxidasy**<sup>(18, 111)</sup>, které se vyskytují především mimo jaterní tkáň. V močovém měchýři je zastoupena prostaglandin H synthasa, v mléčné žláze to je laktoperoxidasa, v plicích a krvi pak myeloperoxidasa. Jejich funkcí je odstranění elektronu ze substrátu. Tím dochází ke vzniku volného amino-kationradikálu. Tyto vzniklé radikály spolu dále reagují disproporcionační či rekombinační reakcí za vzniku chinoniminu, azoderivátů nebo oligomerních produktů<sup>(31)</sup>.

Na N-oxygenaci primárních aminů se malou mírou podílí **Zieglerův enzym**, neboli flavin obsahující monooxygenasa (FMO), který je poměrně hojně zastoupen v plicích. Menší uplatnění Zieglerova enzymu je dáno tím, že pro tuto reakci vyžaduje poměrně elektrofilní aminové skupiny v molekule substrátu<sup>(89)</sup>. Příkladem je 2-naftylamin:



**Obr. 10** Biotransformace 2-naftylaminu

## b) II. fáze biotransformace aromatických aminů

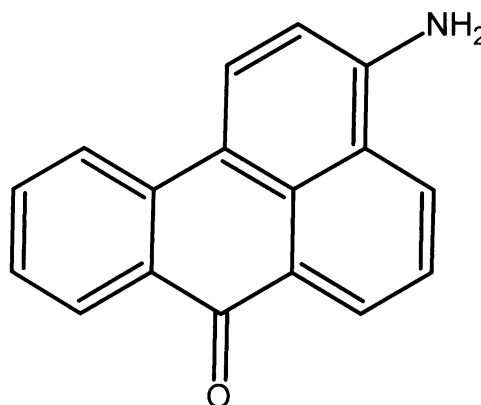
V této konjugáčnické fázi dochází k dalšímu zvýšení polarizace biotransformované sloučeniny. Konjugace aminové skupiny s glutathionem vede ke zvýšení polarizace aminoskupiny, a tím i ke snadnějšímu vyloučení xenobiotika z organismu. Tímto mechanismem je zprostředkována detoxikační cesta<sup>(20, 29)</sup>.

Aktivační cesta probíhá následujícím mechanismem: N-hydroxylovaný arylamin se konjuguje s určitou endogenní kyselinou, za vzniku velmi reaktivních esterů, které se dále rozpadají na reaktivní intermediáty. Příkladem je reakce s acetyl-CoA, kterou katalyzuje N-acetyltransferasa (NAT1, NAT2), kdy dochází ke vzniku N-acetyloxyarylamínů<sup>(90)</sup>.

Vysoce reaktivní sloučeniny se tvoří v játrech při konjugaci N-hydroxylovaného arylaminu s PAPS, za katalýzy arylsulfotransferasy. O-sulfatace N-hydroxylovaných arylaminů vede ke vzniku nitreniového a karbeniového iontu<sup>(91)</sup>.

## 1.5 3-aminobenzanthron

3-Aminobenzanthron (3-amino-7H-benz-[d,e]-anthracen-7-on, 3-ABA), je jedním z aromatických aminů, který byl objeven teprve nedávno, a to v moči pracovníků solných dolů<sup>(92)</sup>. 3-ABA je předpokládán jako hlavní redukční metabolit 3-nitrobenzanthronu.



*Obr. 11* Struktura 3-ABA

### 1.5.1 3-Nitrobenzanthron, prekurzor 3-ABA

Výfukové plyny se skládají z plynné složky, ve které jsou rozptýleny malé částice, na které se absorbují chemické sloučeniny. Takovými sloučeninami jsou také polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a nitrované PAU. Při úniku z technologických zařízení na zpracování aromatických nitrosloúčenin může docházet k lokálnímu znečištění ovzduší.

3-nitrobenzanthron, 3-nitro-7H-benz-[d,e]-anthracen-7on, (3-NBA) byl identifikován ve složkách životního prostředí. Tato sloučenina pravděpodobně vzniká z oxidů dusíku a parentálního PAU, které jsou produkovány vysokoteplotními procesy (spalování fosilních paliv, zpracování kovů atd.). Je součástí výfukových plynů dieslových motorů<sup>(93, 104, 110)</sup>. Někdy je dokonce označován za „ďábla dieslových motorů“. Populace, žijící v oblastech s vysokou automobilovou dopravou, jsou vystaveny vysokým koncentracím této látky. Jeho redukční metabolit, 3-ABA, byl nalezen v moči pracovníků solných dolů<sup>(92)</sup>, kteří k výkonu svého povolání používají sbíječky s dieslovými motory, a tím jsou vystaveni vysokým koncentracím uvedených emisí. 3-NBA byl také detekován v zemské půdě a jako součást srážkových vod<sup>(93, 106, 107, 108)</sup>. Je silným mutagenem, karcinogenem pro hlodavce<sup>(110)</sup> a je potenciálním karcinogenem pro člověka<sup>(93, 94, 104, 109)</sup>.



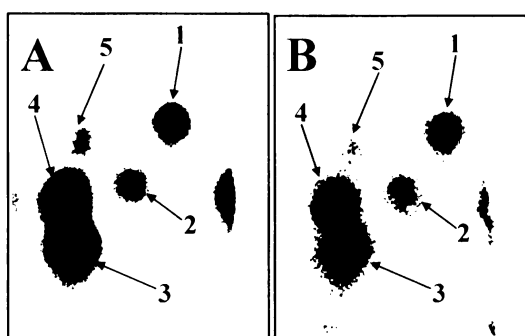
### 1. 5. 2 Předpokládaná metabolická aktivace 3-ABA a 3-NBA

Teprve nedávno bylo zjištěno, že na metabolické aktivaci 3-ABA a 3-NBA se v organismu podílí enzymově katalyzovaná reakce. 3-Nitrobenzanthron je biotransformován NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou a DT diaforasou<sup>(95, 96, 97)</sup>.

V případě 3-ABA se na jeho metabolické aktivaci podílí cytochromy P450<sup>(95)</sup>, které jsou obsaženy v jaterním mikrosomálním systému. Kromě cytochromů P450 se na jeho metabolické aktivaci mohou podílet i další enzymy, které katalyzují oxidační reakce. Takovými enzymy jsou peroxidasy např.: prostaglandin H synthasa<sup>(108)</sup>, která se hojně vyskytuje v močovém měchýři. Nedávno byly provedeny studie *in vitro* také s dalšími peroxidasami, laktoperoxidasou, myeloperoxidasou a křenovou peroxidasou<sup>(111)</sup>. Všechny zmíněné enzymy jsou schopné aktivovat 3-ABA za tvorby aduktů s DNA (**Obr. 12**).

V metabolických studiích bylo zjištěno, že po enzymové aktivaci 3-ABA dochází k tvorbě takových aduktů s DNA,<sup>(95, 96, 103, 105)</sup> které jsou shodné s adukty tvořenými z nitroaromatického prekurzora 3-ABA, tedy z 3-NBA (**Obr. 12**). Aduky byly detekovány metodou <sup>32</sup>P postlabeling<sup>(112)</sup>, a to jak v experimentech *in vitro*<sup>(95, 96, 98 - 105)</sup>, tak i *in vivo*, v různých tkáních laboratorního potkana.

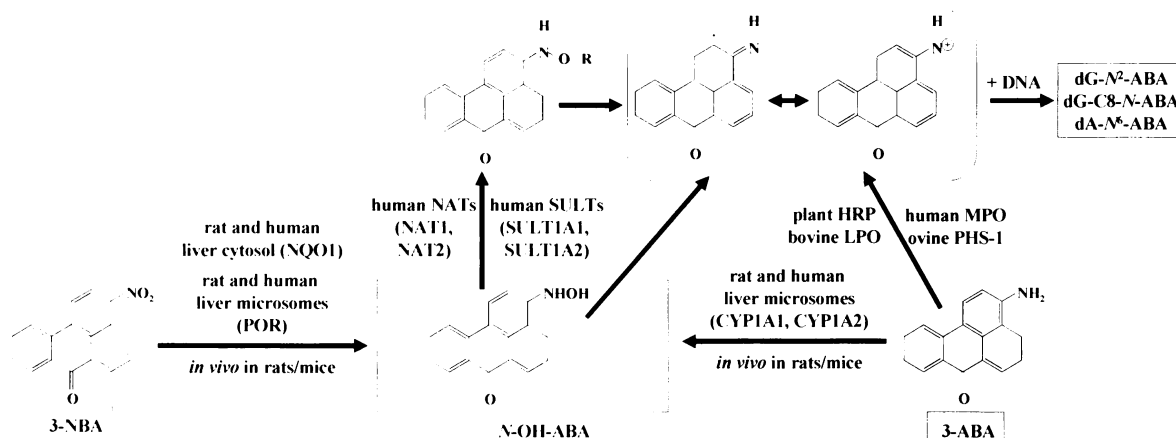
Obrázek 12 ilustruje tvorbu aduktů 3-NBA a 3-ABA po jejich metabolické aktivaci s DNA. Aduky byly detekovány pomocí metody <sup>32</sup>P postlabeling.



**Obr. 12** Autoradiografický snímek aduktů DNA generovaných 3-NBA (A) po aktivaci jaterními cytosoly potkana a na obr. (B) aduktů tvořených po aktivaci 3-ABA jaterními mikrosomy potkana. Použita byla modifikace metody <sup>32</sup>P postlabelingu, (n-butanolová extrakce) Skvrny odpovídají jednotlivým aduktům. Skvrna označená 1 odpovídá aduktu (dA-N<sup>6</sup>-ABA), 2-(2'-deoxyadenosin-N<sup>6</sup>-yl)-3-aminobenzanthron; skvrna 3 odpovídá aduktu (dG-N<sup>2</sup>-ABA), N-(2'-deoxyguanosin-N2-yl)-3-aminobenzanthron a skvrny 4/5 aduktu (dG-C8-N-ABA), N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron<sup>(103)</sup>.

Předpokládané schéma metabolické aktivace 3-ABA a 3-NBA je uvedeno na obrázku 13<sup>(111)</sup>. 3-NBA obsahuje -NO<sub>2</sub> skupinu, která je redukována na N-hydroxylamin (N-OH-ABA). Kritickým intermediátem pro tvorbu elektrofilních nitreniových či karbeniových iontů, které jsou schopné reagovat s nukleofilními centry na molekule DNA za tvorby aduktů, je právě N-OH-ABA. Tento vzniklý N-hydroxylamin (N-OH-ABA) může být dále redukován až na 3-aminobenzanthron.

U 3-aminobenzanthronu je naopak předpokládána oxidační metabolická cesta, zprostředkovaná cytochromy P450, a to především izoformami 1A1 a 1A2, nebo peroxidasami (**Obr. 13**).



**Obr. 13** Předpokládaná metabolická aktivace 3-ABA a tvorba DNA aduktů z aktivovaného 3-NBA a 3-ABA, převzato z <sup>(111)</sup> HRP, křenová peroxidasa; LPO, laktoperoxidasa; MPO, myeloperoxidasa; SULT, sulfotransferasa; NAT, N-acetyltransferasa; PHS, prostaglandin H synthasa.

## 2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo rozšířit poznatky o metabolismu 3-aminobenzanthronu (3-ABA). Tato sloučenina je redukčním metabolitem 3-NBA, vysoce mutagenní a karcinogenní sloučeniny, která je součástí složek životního prostředí.

Konkrétním cílem práce bylo studium metabolismu 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy laboratorního potkana a charakterizace kinetiky reakcí participujících na tomto metabolismu.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Použitý materiál a chemikálie

Chemikálie a materiál použitý v experimentech, pocházejí z následujících zdrojů:

✦ **Chemopetrol, Česká republika**

suchý led

✦ **Fluka, Švýcarsko**

methanol, tris(hydroxymethyl)aminoethan (TRIS)

✦ **Firma RNDr. Jan Kulich, Česká republika**

zkoumadlo Folin-Ciocalteu, fenobarbital

✦ **Lachema, Česká republika**

aceton, ethanol, methanol, glycerol,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , deoxycholát sodný, dithioničitan sodný, HCl, KCl, KOH,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaOH,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , vínán sodnodraselný

✦ **Linde, Česká republika**

kapalný dusík, oxid uhelnatý

✦ **Merck, Německo**

ethylacetát

✦ **Sevapharma a.s., Česká republika**

hovězí sérový albumin (BSA)

✦ **Sigma, USA**

buthanol, NADPH, fenacetin, deoxycholát sodný, dimethylsulfoxid (DMSO)

◆ **Velaz, Česká republika**

laboratorní potkaní kmene Wistar

◆ **3-aminobenzanthron, 3-nitrobenzanthron**

připraveny v Německém centru pro výzkum rakoviny v Heidelbergu

- ◆ jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných  $\beta$ -naftoflavonem, fenobarbitalem, kontrolní mikrosomy nepremedikovaných potkanů, izolovány v laboratoři katedry biochemie. PřF UK

## 3.2 Použité přístroje

◆ **Centrifugy:**

Centrifuga MLW T52.2 (Německo) Ultracentrifugy: Beckman L7-65 ultracentrifuge, Beckman – Coulter – LE-80K (USA), Janetzki K23 (Německo), Janetzki K24 (Německo), Sanyo Micro Centaur MCE (Velká Británie)

◆ **Váhy:**

Analytické váhy PESA 40SM-200A (Švýcarsko), AE ADAM, model AEA100G; předvážky KERN EW600-2M (Německo)

◆ **Spektrofotometry:**

Hewlett Packard E8454 (USA), SPECORD M42 Carl-Zeiss Jena (Německo), Spektromom 195D (MOM) (Maďarsko)

◆ **HPLC:**

pumpa: DIONEX PUMP P580, termokomora pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101, ASI- 100 Automated Sampler Injector, detektor UV/VIS UVD 170S/340S (USA), kolona Macherey –Nagel CC250/4 NUCLEOSIL 100-5 C18 HD (Německo). Předkolona Macherey- Nagel CC8/4 nucleosil 100-5 c18 1Pkg/3Stk, program CHROMELEON<sub>TM</sub> 6.01

## Další přístroje:

pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA) (kalibrace přístroje pomocí standardů Hamilton (Švýcarsko)); magnetická míchačka VARIOMAG, Monotherm (Německo); dotyková míchačka IKA Vortex, Genius 3 (Německo), Minishaker 1 IKA (Německo); sonikátor Tesla TESON1, Tesla UC 005 AJ1; inkubátor Thermomixer Compact Eppendorf 5350 (Německo); automatické pipety: BIOHIT (Finsko), Nichiryo NICHIPET EX (Japonsko); Hamiltonova stříkačka (Švýcarsko), Potterův-Elvehjemův homogenizátor

## 3.3 Metody

### 3.3.1 Premedikace laboratorních potkanů (Stiborová M., ústní sdělení)

K premedikaci byli použiti samci laboratorních potkanů kmene Wistar o hmotnosti 100 až 120 gramů, kteří byli drženi při teplotě  $22 \pm 2$  °C. Voda a granulovaná strava jim byly podávány *ad libitum*. Premedikace byla zahájena po zhruba týdenní aklimatizaci. Den před zabitím byla potkanům odebrána strava.

#### Premedikace potkanů $\beta$ -naftoflavonem (Stiborová M., ústní sdělení)

$\beta$ -naftoflavon byl rozpuštěn v rostlinném oleji Vegetol (4 mg/ml). Premedikace byla prováděna intraperitoneálně, po dobu tří za sebou následujících dnů v dávkách 60 mg  $\beta$ -naftoflavonu na 1 kg hmotnosti zvířete. Čtvrtý den byla zvířata usmrcena a provedena izolace subcelulárních frakcí z jaterní tkáně.



**Obř. 14** Nákres intraperitoneální aplikace <sup>(116)</sup>

**Premedikace potkanů fenobarbitalem** (Stiborová M., ústní sdělení)

Samci potkanů byli premedikováni 0,1% roztokem fenobarbitalu, který jim byl podáván rozpuštěný ve vodě, ke které měli přístup *ad libitum*. Premedikace probíhala po dobu sedmi dní. Osmý den byla zvířata usmrcena a provedena izolace subcelulárních frakcí z jaterní tkáně.

**3.3.2 Izolace subcelulární frakce z jaterní tkáně laboratorního potkana<sup>(114)</sup>**♦ **Složení použitých pufků:**

**pufř P1** 150 mM KCl, 50 mM TRIS, pH 7,4, 2000 ml

**pufř P2** 100 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O, pH 7,2, 1000 ml

**pufř P3** 150 mM KCl, 50 mM TRIS, 20% glycerin, pH 7,4, 100 ml

Vyjmutá játra byla zvážena (59 g), 2x promyta pufřem P1 a nastříhána na drobné kousky. Přes gázu byla odlita část pufřu s krví. Homogenizace tkáně probíhala při 6°C v homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema v takovém množství pufřu **P1**, jehož objem v mililitrech odpovídal čtyřnásobku váhy orgánů v gramech. Homogenizace byla uskutečněna postupně, a to nejdříve v homogenizátoru s větším průměrem, následně v homogenizátoru s menším průměrem.

Získaný homogenát byl filtrován přes gázu a centrifugován 10 minut při 600 x g, neboli 2 000 RPM (centrifuga K23, Janetzki, Německo) ve výkyvném rotoru 4 x 70 ml, při chlazení 4°C. Peleta byla rehomogenizována v homogenizátoru s menším průměrem v pufřu **P1**, jehož objem odpovídal hmotnosti jater a poté centrifugována za stejných podmínek. Supernatant byl uschován. Oba získané supernatanty byly spojeny dohromady a centrifugovány po dobu 20 minut při 15 000 x g, tedy 13 500 RPM (centrifuga K24, Janetzki, Německo) v úhlovém rotoru 6 x 35 ml za chlazení na 4°C. Kyvety byly plněny do 2/3 výšky. Supernatant byl slit a centrifugován při 123 000 x g neboli 35 000 RPM (ultracentrifuga Beckman Coulter Optima LE-80K) 75 minut v úhlovém rotoru 6 x 64 ml při 4°C. Pro správný chod ultracentrifugy bylo nutno kyvety plnit až po okraj a dokonale vyvážit i s víčky na předvážkách. Cytosolární supernatant byl odlit a zmražen na -80°C. Pelety byly opět resuspendovány v homogenizátoru s menším průměrem v pufřu **P2**, a to

v takovém množství, jenž odpovídalo dvojnásobné hmotnosti orgánů. Homogenát byl centrifugován při 70 000 RPM po dobu 75 minut (ultracentrifuga Beckman Coulter Optima LE-80K, USA) za chlazení 4°C.

Získaná peleta byla resuspendována v pufru **P3** v objemu odpovídajícímu 1/5 původní hmotnosti orgánů a rehomogenizována pomocí malého homogenizátoru. Výsledný mikrosomální preparát byl pipetován po alikvotech (1 ml) do mikrozkušavek eppendorf a zmražen v kapalném dusíku. Následně byly alikvoty uloženy do mrazícího boxu a skladovány při -80°C.

### 3.3.3 Stanovení obsahu cytochromu P450

Principem metody pro stanovení obsahu cytochromu P450 v mikrosomálních preparátech je využití charakteristické absorpce komplexu cytochromu P450 v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm<sup>(39)</sup>. Na základě tohoto jevu se provádí stanovení koncentrace cytochromu P450 metodou diferenčních spekter<sup>(39)</sup>.

#### **Postup:**

Do zkumavky bylo pipetováno 1960 µl pufru (0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2% glycerol; pH 7,5) a bylo přidáno 40 µl vzorku mikrosomů. Redukce cytochromu P450 byla uskutečněna přidáním malého množství (~5 mg) dithioničitanu sodného. Směs byla opatrně promíchána tak, aby v ní nevznikaly bubliny. Následně byl vzorek rozdělen po 1 ml do dvou křemenných kyvet o optické dráze 1 cm a na dvoupraprskovém přístroji Specord M42 (Carl Zeiss Jena, Německo) byla proměřena základní linie („base line“) v rozmezí 400 až 500 nm. Vzorková kyveta byla následně sycena po dobu 60 sekund proudem oxidu uhelnatého a proměřeno diferenční spektrum.

Koncentrace cytochromu byla vypočtena z následujícího vztahu:

$$c_{P450} = A_{450} - A_{490} / \varepsilon_{P450} \cdot \text{ředění} \quad [\mu M]$$

$c_{P450}$  koncentrace cytochromu P450

$A_x$  absorbance při vlnové délce x nm

$\varepsilon_{P450}$  molární absorpční koeficient cytochromu P450;

( $\varepsilon = 0,091 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ )



### 3.3.4 Stanovení koncentrace proteinu metodou dle Lowryho<sup>(113)</sup>

Princípem tohoto stanovení je reakce bílkovin s měďnatými ionty v alkalickém prostředí, (stabilizovanými jako vínanový komplex), při které vznikají ionty měďné. Tyto ionty mohou spolu s aromatickými zbytky, které jsou přítomny v bílkovině, fungovat jako redukční činidlo. Typický modrý komplex vzniká po redukcí fosfomolybdenanových a fosfowolframových iontů, které jsou obsaženy ve fenolovém činidle dle Folina a Ciocalteaua. Modré zabarvení se stanovuje spektrofotometricky při 550 nm ( $A_{550}$ ) a je přímo úměrné koncentraci bílkoviny.

#### *Postup:*

50  $\mu$ l vzorku bylo doplněno destilovanou vodou do celkového objemu 0,5 ml. Od každého vzorku byly připraveny triplety. Pak bylo přidáno 150  $\mu$ l 2% (w/v) roztoku deoxycholátu sodného a 150  $\mu$ l 2 M NaOH. Roztok byl důkladně promíchán při nižších otáčkách na dotykové míchačce „vortex“ a nechán stát 10 minut při laboratorní teplotě. K roztoku byly dále přidány 3 ml čerstvě připraveného alkalického činidla (0,5 ml 1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (w/v); 0,5 ml 2% vínanu sodnodraselného (w/v); 49 ml 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (w/v)), vše bylo opět promícháno a ponecháno stát 10 minut. Poté bylo přidáno 300  $\mu$ l komerčního Folinova činidla, které bylo těsně před použitím zředěno 1:1 destilovanou vodou. Po promíchání se vzorky nechaly opět 30 minut stát.

Po 30 minutách byla ihned měřena absorbance při vlnové délce 550 nm oproti „slepému“ vzorku, který obsahoval místo roztoku bílkoviny 0,5 ml destilované vody. Měření bylo provedeno na přístroji Spektromom 195D v kyvetách o optické dráze 1 cm.

Paralelně se vzorky byl taktéž měřen vzorek obsahující standard BSA o koncentraci (1,6 mg/ml), který byl ředěn do 0,5 ml destilovanou vodou 1:1 na následující koncentrace: 1,6 mg/ml až na 0,05 mg/ml. Ze získaných hodnot pro standard BSA byla sestrojena kalibrační přímka, ze které byla následně odečtena koncentrace měřeného proteinu.

### 3.3.5 Studium oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana, obsahujícími cytochrom P450

Ke studiu metabolismu 3-ABA byly využity mikrosomální frakce jater potkana izolované ze tří skupin laboratorních potkanů.

Jednak z potkanů premedikovaných  $\beta$ -naftoflavonem, dále fenobarbitalem a třetí frakce byla z nepremedikovaných, tedy kontrolních potkanů.

#### 3.3.5.1 Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana

- ◆ **Složení inkubační směsi:**
  - 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4
  - 2 mM 3-ABA rozpuštěný v DMSO
  - 10 mM NADPH
  - jaterní mikrosomy potkana (kontrolní;  
indukované  $\beta$ -naftoflavonem, fenobarbitalem)
  - 1 mM fenacetin

#### **Postup:**

Do inkubační směsi o celkovém objemu 500  $\mu\text{l}$  byl pipetován fosfátový pufr, dále 50  $\mu\text{l}$  10 mM NADPH (roztok NADPH byl připraven vždy těsně před přípravou inkubační směsi), příslušné mikrosomy potkana v  $\mu\text{l}$  tak, aby výsledná koncentrace proteinu v inkubační směsi byla 0,5 mg/ml. Vše bylo promícháno pipetou a reakční směs byla startována přidáním 5  $\mu\text{l}$  2 mM 3-ABA. Směs byla opět dobře promíchána a inkubována v otevřených mikrozkušavkách v termomixeru eppendorf při 400 RPM po dobu 120 minut.

Reakce byla po přidání 5  $\mu\text{l}$  1 mM fenacetinu, jako vnitřního standardu a promíchání na „vortexu“ ukončena přidáním 500  $\mu\text{l}$  ethylacetátu. Extrakce do tohoto organického rozpouštědla probíhala následovně: mikrozkušavky byly promíchávány na Minishakeru 1 po dobu dvou minut při 2 700 RPM. Následně byla směs centrifugována na centrifuze Micro Centaur při 13 000 RPM po dobu tří minut. Organická fáze, obsahující produkty reakce, byla odebrána a k vodné fázi bylo opět přidáno 500  $\mu\text{l}$  ethylacetátu. Stejným postupem byla provedena druhá extrakce.

Obě organické fáze byly spojeny a odpařeny do sucha v digestoři (cca 3-4 hodiny). Odpařené vzorky byly uchovávány v mrazícím boxu při -20°C. Takto byly vždy připraveny 2 paralelní vzorky a ke každé sadě vzorků byla připravena kontrola bez mikrosomů a bez NADPH. Vodné fáze byly uchovávány v ledničce a použity pro další analýzu, kap.3.3.5.8.

Těsně před analýzou byly odparky vzorků získané extrakcí ethylacetátem rozpuštěny ve 30  $\mu$ l methanolu. Produkty reakce byly separovány a kvantifikovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

### **3. 3. 5. 2 Studium časové závislosti oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy**

- a) *Časová závislost oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem*
- b) *Časová závislost oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem*
- c) *Časová závislost oxidace 3-ABA kontrolními jaterními mikrosomy potkana (nepremedikovaný potkan)*

Složení inkubačních směsí bylo stejné jako v kap. 3.3.5.1., postup také, až na dobu inkubace. V tomto experimentu byla měněna doba inkubace, a to v následujících intervalech: 0 minut, 30 minut, 60 minut, 120 minut, 180 minut.

### **3. 3. 5. 3 Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy v časovém intervalu do 30 minut inkubace**

Složení inkubačních směsí a postup práce byl stejný jako v kap. 3.3.5.1. Pro přesnější představu o oxidaci 3-ABA byla rozšířena časová studie, a to nejdříve o následující doby inkubace: 0 minut, 10 minut, 20 minut, 30 minut.

Jelikož i toto časové rozšíření nebylo dostačující pro následující kinetické studie, přistoupili jsme k dalšímu rozšíření časové závislosti o následující doby inkubace: 0 minut, 3 minuty, 5 minut, 10 minut.

### 3.3.5.4 Kinetická studie oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana

Kinetické studie oxidace 3-ABA mikrosomálními systémy byly prováděny za reakčních podmínek popsaných v kap.3.3.5.1. Dle předchozí časové závislosti byla zvolena doba inkubace 5 minut. V této studii jsme měnili koncentraci 3-ABA v reakční směsi, a to dle následující škály:

5  $\mu$ M 3-ABA v reakční směsi

10  $\mu$ M 3-ABA v reakční směsi

20  $\mu$ M 3-ABA v reakční směsi

30  $\mu$ M 3-ABA v reakční směsi

40  $\mu$ M 3-ABA v reakční směsi

50  $\mu$ M 3-ABA v reakční směsi

Byly připraveny zásobní roztoky 2 mM 3-ABA a 5 mM 3-ABA, rozpuštěné v DMSO tak, aby v každé inkubaci byl stejný objem vzorku obsahujícího DMSO, tedy 5  $\mu$ l.

Všechny vzorky byly vždy připraveny ve dvou exemplářích a k nim byl připraven jeden kontrolní vzorek, který neobsahoval mikrosomy.

### 3.3.5.5 Vliv pH na oxidaci 3-ABA pomocí jaterních mikrosomů potkanů indukovaných $\beta$ -naftoflavonem, fenobarbitalem a kontrolního (neindukovaného) potkana

Složení inkubační směsi jako v kap. 3.3.5.1, doba inkubace byla 10 minut. Změna oproti kap. 3.3.5.1 byla v pH použitého fosfátového pufru. Byly použity pufrы o pH: 5,4; 6,4; 7,4; 8,4; 9,4. Ke všem paralelním vzorkům byly opět připraveny i kontrolní vzorky bez mikrosomů.

### 3.3.5.6 Příprava vzorků pro HPLC, podmínky separace a kvantifikace metabolitů 3-ABA HPLC

#### *Příprava vzorku:*

Odpařené vzorky byly, těsně před analýzou, rozpuštěny ve 30 mikrolitrech methanolu (FLUKA). Mikrozkuhavka se vzorkem byla cca 40 sec. silně míchána na „vortexu“ a centrifugována na centrifuze Micro Centaur po dobu 3 minut při

13 000 RPM. Takto připravený vzorek byl aplikován automatickým dávkovačem (Autosampler injector dionex) na kolonu systému HPLC.

***Podmínky HPLC:***

mobilní fáze: 70% methanol (Fluka)

průtok: 0,6 ml/min

nástrik: 20  $\mu$ l

teplota: 35°C

detekce: 254 nm

Za těchto podmínek byla sledována oxidace 3-ABA v kapitolách 3.3.5.1-3.3.5.7

### **3. 3. 5. 7 Příprava vzorků standardů 3-ABA a 3-NBA pro HPLC**

***Příprava standardních vzorků 3-ABA a 3-NBA:***

5  $\mu$ l 2 mM 3-ABA bylo rozpuštěno ve 30  $\mu$ l methanolu, směs byla důkladně promíchána a analyzována dle podmínek HPLC uvedených v kap.3.3.5.6. Pro detekci elučního času standardu 3-NBA bylo použito 5  $\mu$ l 1 mM 3-NBA rozpuštěného v 30  $\mu$ l methanolu. Směs byla opět důkladně promíchána a analyzována na HPLC.

### **3. 3. 5. 8 Studium vazby 3-ABA po jeho aktivaci mikrosomálními systémy na proteiny**

3-ABA je barevnou sloučeninou, rovněž jako potenciální produkty jeho oxidace mikrosomálními systémy. Při jeho oxidaci mikrosomálním systémem může docházet k vazbě reaktivních metabolitů 3-ABA na protein. Lze předpokládat, že modifikovaný protein bude vykazovat jiné spektrální vlastnosti, než mikrosomální proteiny původní (neindukované). Skutečně mikrosomální proteiny, modifikované aktivovaným 3-ABA, vykazují nový spektrální pás s maximem absorpce při 360 nm. Proto jsme ke studiu vazby 3-ABA, (produktů jeho oxidace) na protein využili vodné fáze z jednotlivých inkubací, které jsme získali po odebrání extrahované organické fáze dle kap. 3.3.5.1.

Míra vazby aktivovaného 3-ABA na protein pak byla určena z poměru absorbance daného vzorku proteinu při 360 nm ku jeho koncentraci.

Proteiny jednotlivých vodných fází získaných po extrakci ethylacetátem byly precipitovány přidáním 3,5 ml acetonu. Takto precipitovaná proteinová frakce byla centrifugována na centrifuze MLW 52.2T na rychlost 8 000 RPM po dobu 10 minut.

Následně byla odstraněna acetonová frakce. Peleta na dně zkumavky byla promyta 2 ml acetonu a opět centrifugována na centrifuze MLW 52.2T za stejných podmínek. Acetonový supernatant byl opět odstraněn a peleta byla promyta 1 ml 100% ethanolu. Po důkladném promíchání opět následovala centrifugace za stejných podmínek. Ethanol byl odstraněn a nakonec byla peleta promyta 1 ml 70% ethanolu. Směs s ethanolem byla opět míchána a centrifugována jako za výše uvedených podmínek.

Po centrifugaci a odstranění ethanolu byly pelety vysušeny proudem vzduchu v digestoři. K vysušeným peletám byl přidán 1 ml 1 mM NaOH, a tato směs byla pozvolně zahřívána ve vodní lázni na max 60-70°C, až do rozpuštění proteinových pelet.

Ve vzorcích takto připravených bylo měřeno absorpční spektrum na spektrofotometru Hewlett Packard E8454. Jako „blank“ byl použit 1 mM roztok NaOH.

Kromě spekter byl ve vzorcích stanoven i obsah proteinu, a to metodou dle Lowryho<sup>(113)</sup>. Ze získaných hodnot byl určen poměr mezi absorbancí vzorku při 360 nm, kde byl nalezen nový „pík“ modifikovaného proteinu a koncentrací proteinu (A/c). Tento poměr ilustruje vazbu aktivovaného 3-ABA na proteiny a je dále označován jako specifická vazba 3-ABA na proteiny.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Studium oxidace 3-ABA mikrosomálními systémy, obsahujícími cytochrom P450, izolovanými z jater potkana

Oxidace 3-aminobenzanthronu byla studována pomocí mikrosomálních systémů potkana obsahujících cytochromy P450. Při studiu 3-ABA byly použity mikrosomy izolované z jater laboratorních potkanů, a to z potkanů premedikovaných  $\beta$ -naftoflavonem či fenobarbitalem. Ke studiu byly použity i mikrosomy kontrolní, tedy z nepremedikovaných potkanů.

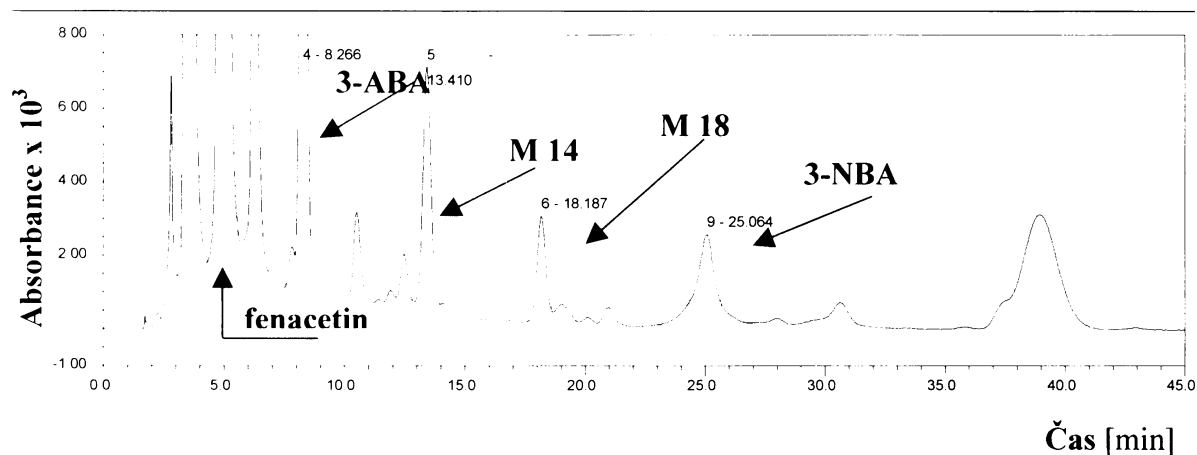
Mikrosomy indukované  $\beta$ -naftoflavonem obsahují především cytochromy P450 podrodiny 1A. Mikrosomy indukované fenobarbitalem obsahují nejvíce cytochromy P450 podrodiny 2B.

Produkty oxidace 3-ABA byly separovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

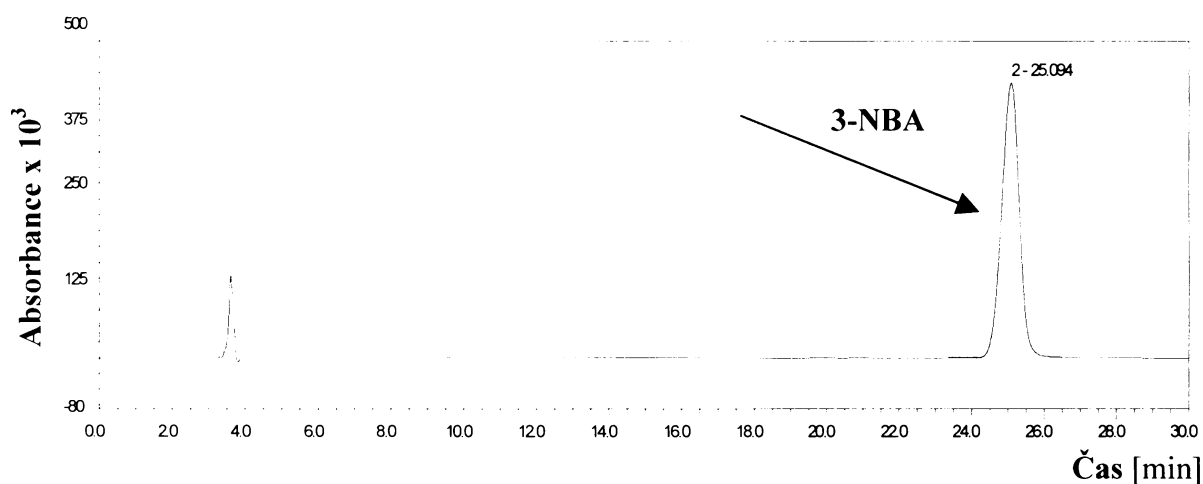
Zjistili jsme, že všechny tři užívané mikrosomální systémy, izolované z jater laboratorního potkana oxidují 3-ABA na tři metabolity (*Obr. 15, str. 48*):

- ◆ Metabolit označovaný jako M14, který byl eluován v retenčním čase 14 minut
- ◆ Metabolit označovaný M18, který byl eluován v retenčním čase 18 minut. Struktura metabolitů M14 a M18 nebyla dosud charakterizována.
- ◆ Jako třetí metabolit, eluovaný v retenčním čase 25 minut, byl identifikován 3-nitrobenzanthron (3-NBA).

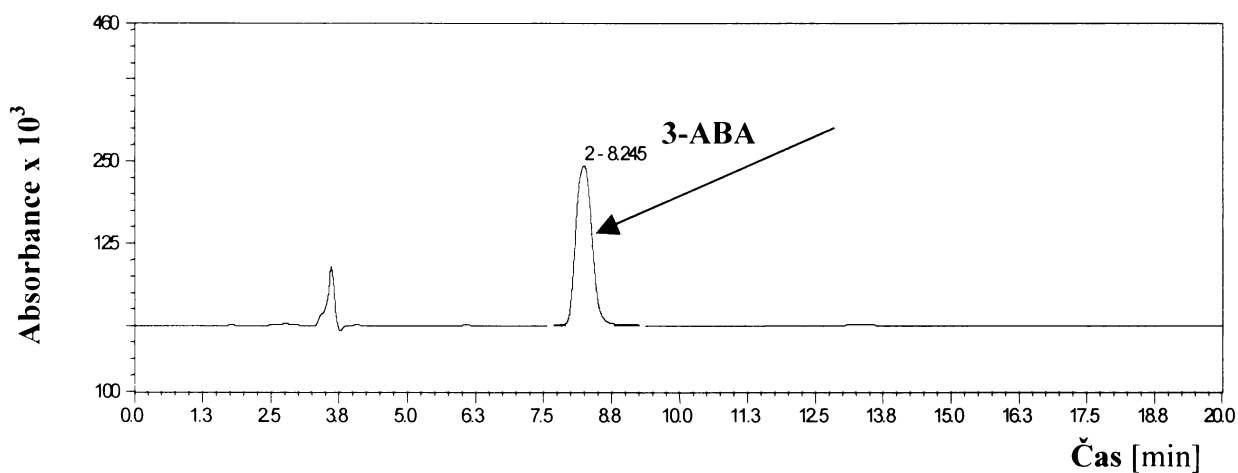
Ostatní „píky“ v chromatogramu na obrázku 15, str. 48 byly detekovány i v kontrolních vzorcích (obsahujících mikrosomy a NADPH bez 3-ABA). Jejich původ tedy netkví v metabolismu 3-ABA. Na obrázku 16, str. 48 je uveden chromatogram standardního vzorku 3-NBA. Na obrázku 17, str. 48 je chromatogram standardního vzorku 3-ABA, jehož retenční čas je 8 minut. Získané chromatogramy byly kvantitativně vyhodnocovány pomocí integrace ploch „píků“, které reprezentují jednotlivé produkty reakce.



**Obr. 15** HPLC reakční směsi sledující oxidaci 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem. Doba inkubace 120 minut, koncentrace 3-ABA 20  $\mu\text{M}$ . HPLC byla prováděna postupem popsaným v kapitole 3.3.5.6.



**Obr. 16** HPLC standardního vzorku 3-NBA, (koncentrace 3-NBA 0,17  $\mu\text{M}$ ), postup dle kap. 3.3.5.7



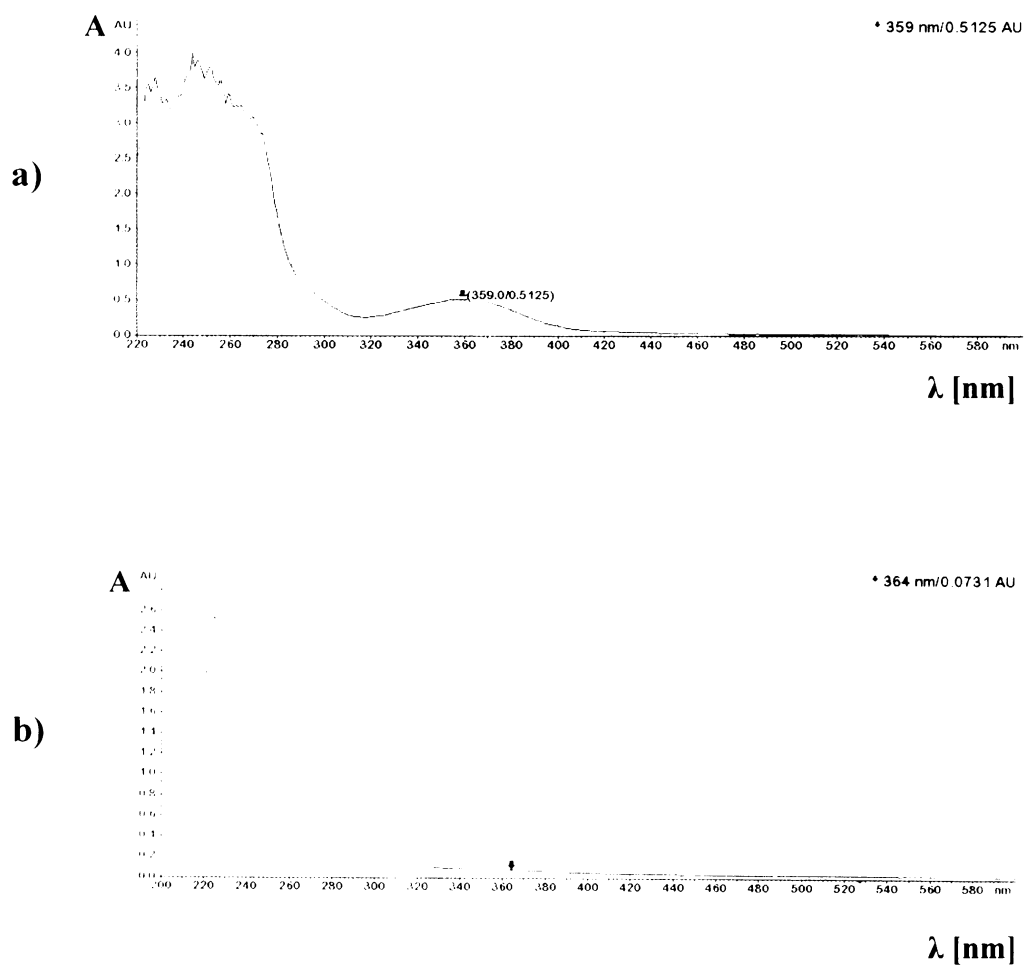
**Obr. 17** HPLC standardního vzorku 3-ABA, (koncentrace 3-ABA 0,33  $\mu\text{M}$ ), postup dle kap. 3.3.5.7.



#### **4.1.1 Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného: $\beta$ -naftoflavonem, fenobarbitalem a kontrolními mikrosomy neindukovaného potkana**

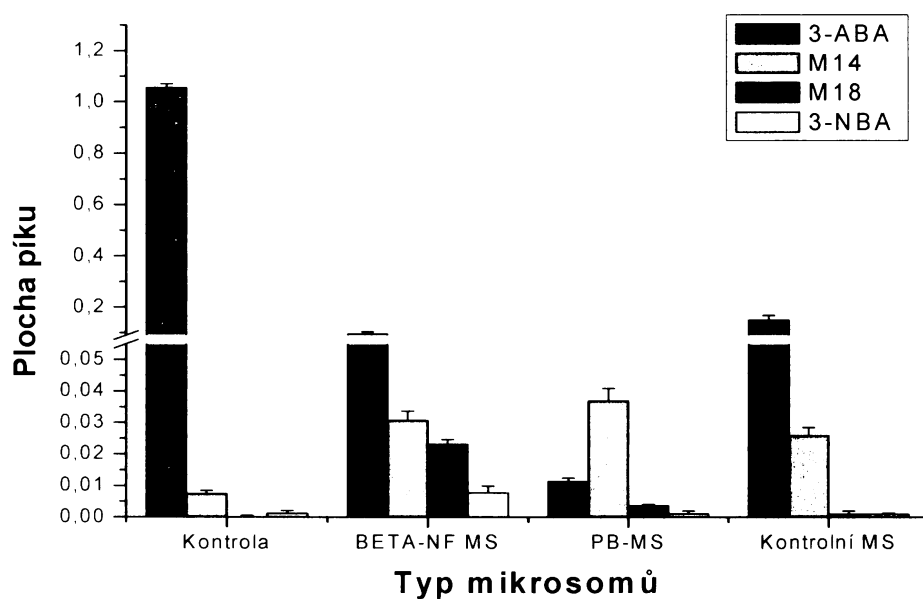
Reakční směs sledující oxidaci 3-ABA jaterními mikrosomy, byla připravena dle postupu viz. kap.3.3.5.1 a metabolity separovány pomocí HPLC. Plochy jednotlivých „píků“ byly kvantitativně vyhodnoceny pomocí integrace ploch „píků“ a vztažené na vnitřní standard, fenacetin, (relativní plocha píku). Jak již bylo výše uvedeno, jako produkty oxidace jsme detekovali neznámý metabolit M14, eluovaný v retenčním čase 14 minut, dále neznámý metabolit M18 eluovaný v retenčním čase 18 minut a 3-NBA, který byl eluován v retenčním čase 25 minut.

Sledovali jsme i vazbu 3-ABA po jeho aktivaci mikrosomy na proteiny tohoto subcelulárního systému. Lze předpokládat, že při vazbě aktivovaného 3-ABA na protein, dojde vazbou ke změně spektra modifikovaných proteinů. Vazba aktivovaného 3-ABA na proteiny byla tedy sledována pomocí proměření spekter vodných fází, získaných po extrakci inkubační směsi ethylacetátem. Pro ilustraci je na obrázku 18 (str. 50) ukázáno absorpční spektrum takového vzorku. Jak je z obrázku 18a, str. 50 patrné, proteiny modifikované aktivovaným 3-ABA, vykazují nový absorpční pás s maximem absorbance při 360 nm. Jako specifickou vazbu 3-ABA na mikrosomální proteiny jsme pak označili poměr absorbance při 360 nm ku koncentraci proteinu dané vodné fáze, získané po extrakci inkubační směsi ethylacetátem. Koncentraci proteinu jsme stanovovali metodou dle Lowryho<sup>(113)</sup>.



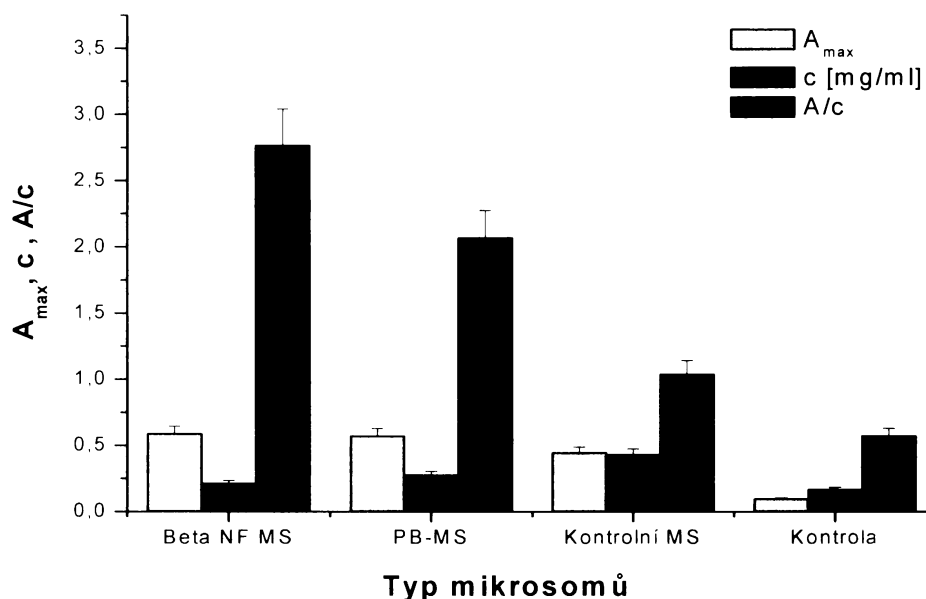
**Obr. 18** Absorpční spektrum inkubační směsi sledující oxidaci 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem po extrakci ethylacetátem (a) a spektrum analogické inkubační směsi s 3-ABA, ale bez NADPH (koenzymu mikrosomálního monooxygenasového systému) (b).

Zjistili jsme, že z hlediska oxidace 3-ABA, jsou nejefektivnějším systémem jaterní mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem, (frakce „nabohacená“ CYP2B). Při oxidaci 3-ABA tímto systémem docházelo k jeho největší přeměně a tvorbě metabolitu M14 (*Obr. 19*). Jako další efektivní systém byl pro oxidaci 3-ABA shledán jaterní mikrosomální systém potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem (frakce „nabohacená“ CYP1A1 a 1A2). V tomto případě se tvořil nejvíce nejen metabolit M14, ale též metabolit M18 (*Obr. 19*).



**Obr. 19** Oxidace 3-ABA jednotlivými typy jaterních mikrosomů potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem, fenobarbitalem a mikrosomy nepremedikovaného potkana. Složení reakční směsi je popsáno v kapitole 3.3.5.1, doba inkubace byla 120 minut. Kontrolou je inkubační směs bez NADPH. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

U jednotlivých typů mikrosomů jsme sledovali vazbu 3-ABA po jeho aktivaci daným mikrosomálním systémem na mikrosomální protein. Vzhledem k tomu, že mikrosomální proteinová směs modifikovaná aktivovaným 3-ABA vykazovala absorpenci při 360 nm, byla absorbance při této vlnové délce užita pro určení míry modifikace proteinů (**Obr. 20**).



**Obr. 20** Vazba 3-ABA po jeho aktivaci jaterními mikrosomy potkana na proteiny. Jednotlivé vzorky jsou proteinové frakce získané po 120 minutové inkubaci s 3-ABA a po extrakci ethylacetátem. Kontrolou je inkubační směs bez mikrosomů. Kontrolní MS jsou proteinové frakce z mikrosomů kontrolního potkana (neindukovaného). Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

Ze získaných výsledků na obrázku 20 je patrné, že největší vazbu aktivovaného 3-ABA na protein zprostředkovává jeho metabolismus jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem. Dále pak jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem. Nejméně aktivovaly 3-ABA enzymy mikrosomů potkanů neindukovaných.

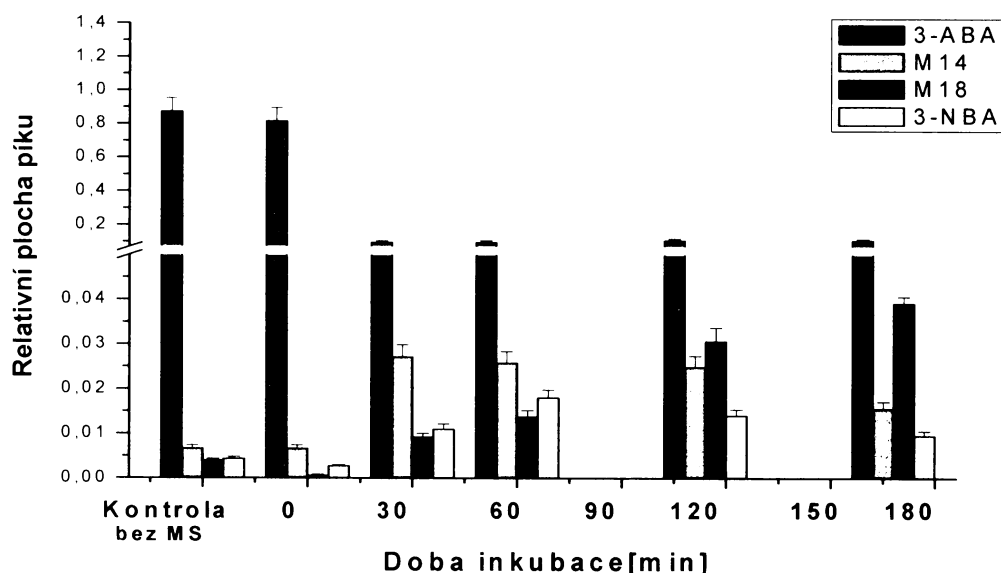
#### 4.1.2 Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana v závislosti na době inkubace

Reakční směs byla připravena dle kapitoly 3.3.5.2. a inkubována za přítomnosti vzduchu za stálého třepání (400 RPM), při teplotě 37°C po dobu 0, 30, 60, 120, 180 minut. Produkty oxidace 3-ABA byly separovány pomocí HPLC.

##### a) Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného $\beta$ -naftoflavonem

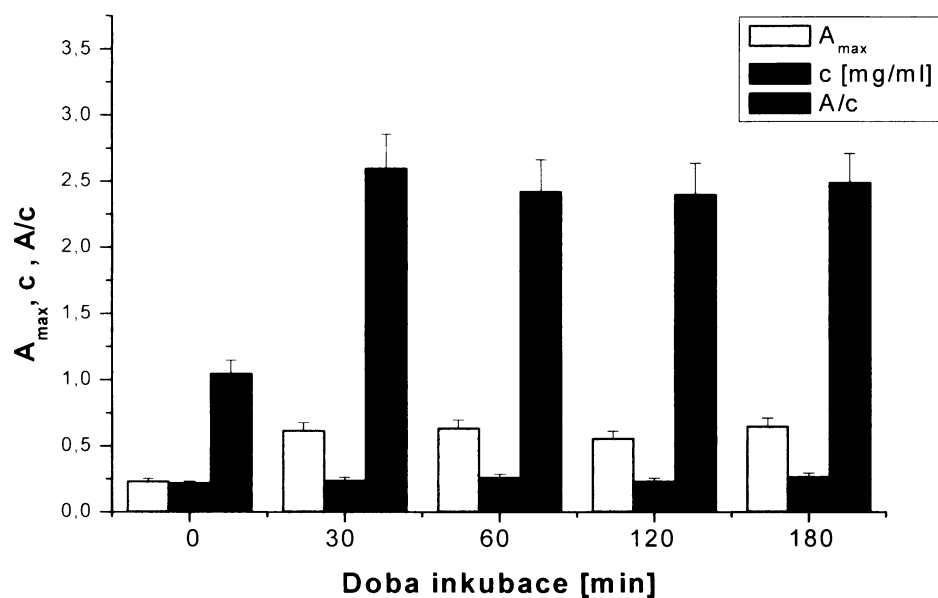
Jak z výsledků uvedených na obrázku 21 vyplývá, je rychlost oxidace 3-ABA závislá na době inkubace reakční směsi. V průběhu třicetiminutové inkubace je v reakci spotřebováno více než 88,5 % 3-ABA. Ten je oxidován za tvorby metabolitu M18, a to až do doby inkubace 180 minut. Tvorba metabolitu M14 roste do doby inkubace reakční směsi 30 minut, pak následuje pozvolný pokles tvorby tohoto metabolitu.

Tvorba metabolitu oxidovaného na amino skupině 3-ABA, 3-NBA, dosáhla maxima při 60 minutách inkubace, se vzrůstajícím časem inkubace však docházelo k poklesu tvorby tohoto metabolitu.



**Obr. 21** Závislost oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem na době inkubace. Složení inkubační směsi dle kap. 3.3.5.2. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

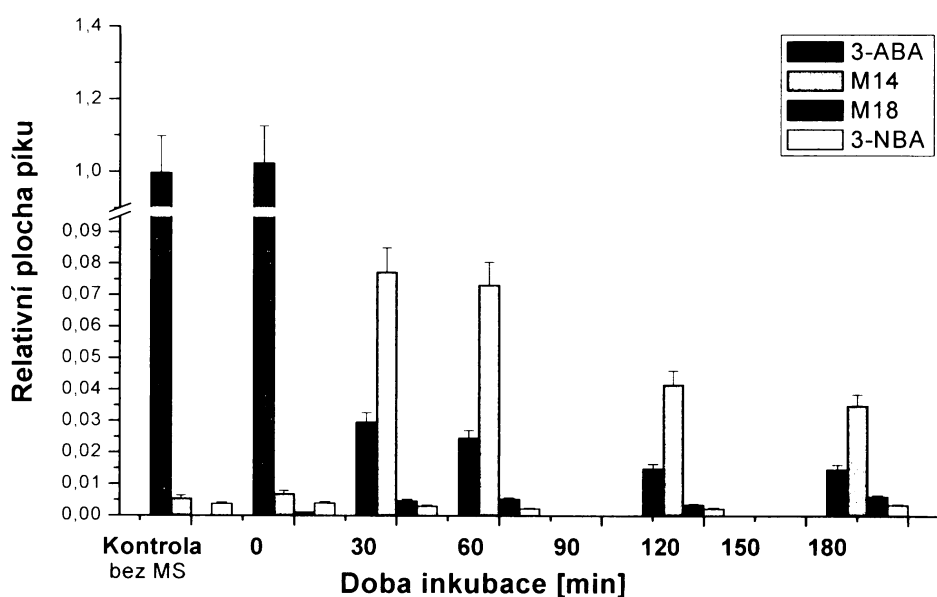
Na obrázku 22 je uvedena vazba 3-ABA, popřípadě jeho metabolitů, na mikrosomální protein v závislosti na době inkubace reakční směsi. S dobou inkubace rostla hodnota absorpce jednotlivých proteinových frakcí až do 30 minut inkubace. Poté se množství navázaného, aktivovaného 3-ABA na proteiny neměnilo.



**Obr. 22** Vazba 3-ABA po jeho aktivaci jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem na mikrosomální proteiny. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

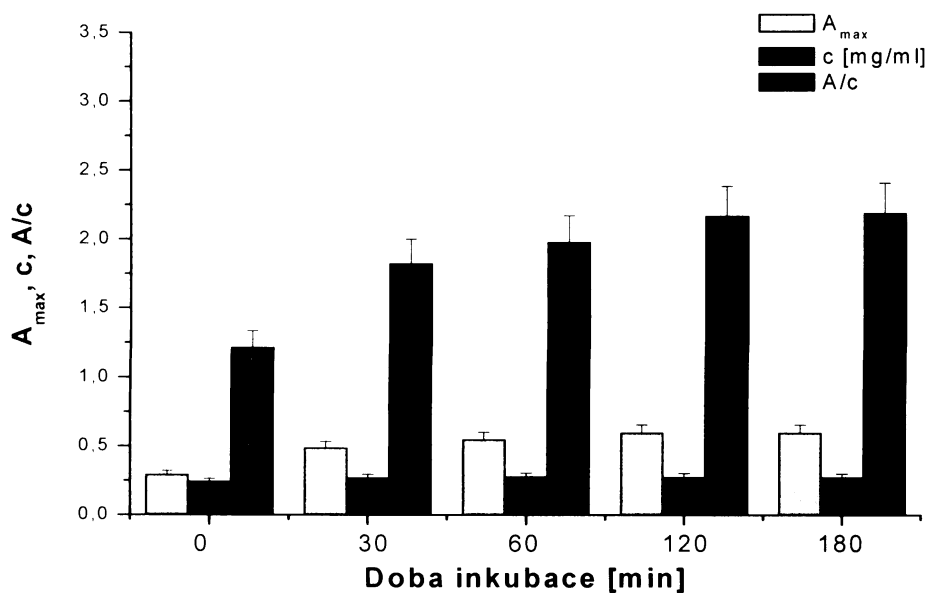
b) *Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem*

I v případě oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem (**Obr. 23**) jsme zjistili, že rychlost oxidace 3-ABA je závislá na době inkubace reakční směsi. V prvních třiceti minutách inkubace je přeměňováno 97 % 3-ABA. Tato přeměna je o 10 % vyšší, než v případě oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem. V tomto jaterním mikrosomálním systému potkana indukovaného fenobarbitalem je 3-ABA oxidován za tvorby metabolitu M14, a to s maximem jeho tvorby ve 30 minutách inkubace. Metabolit M18 se tvořil také, ale v daleko menší míře, než v systému oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem. Tvorba dalšího metabolitu, 3-NBA, klesala v prvních třiceti minutách inkubace, po 60 minutách inkubace byl zaznamenán opět pozvolný nárůst tohoto metabolitu.



**Obr. 23** Závislost oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem v závislosti na době inkubace. Složení inkubační směsi dle kapitoly 3.3.5.2. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

Vazbu 3-ABA, případně produktů jeho oxidace na proteiny jaterních mikrosomů potkana indukovaného fenobarbitalem v závislosti na době inkubace, ilustruje obrázek 24. Se zvyšující se dobou inkubace rostla absorbance jednotlivých proteinových frakcí, což ilustruje nárůst aktivovaného 3-ABA.

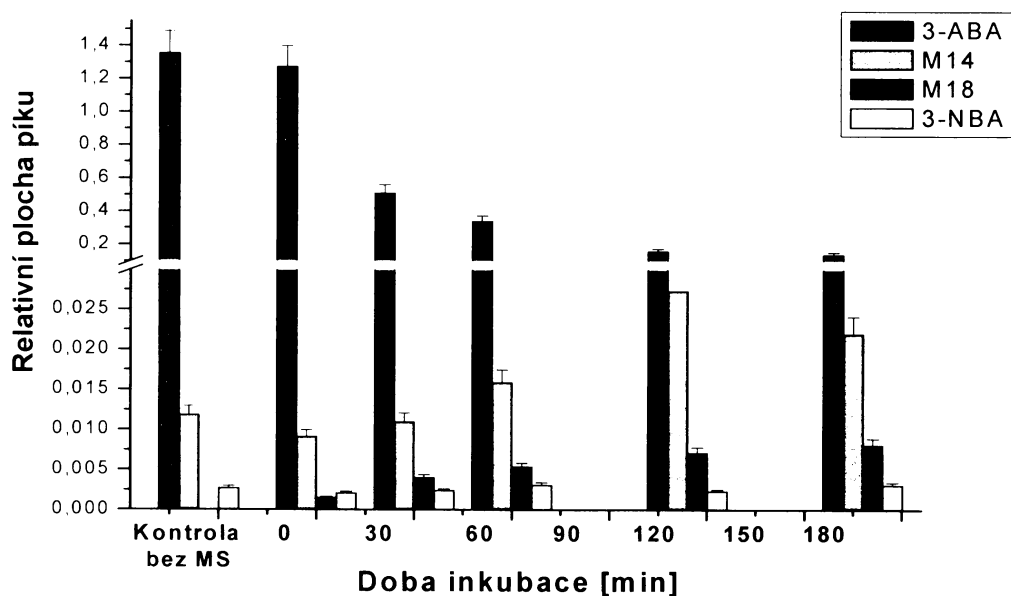


**Obr. 24** Vazba 3-ABA po jeho aktivaci jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem na mikrosomální proteiny. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.



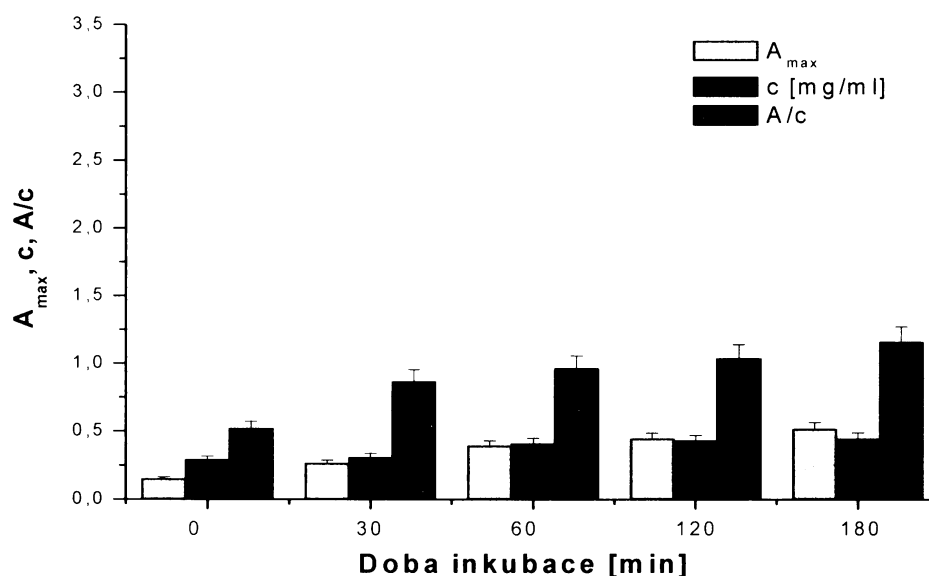
c) *Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních (neindukovaných) potkanů*

I v případě tohoto mikrosomálního systému jsme zjistili, že je rychlost oxidace 3-ABA závislá na době inkubace reakční směsi. Opět zde docházelo ke přeměně 3-ABA, jeho úbytek ale nebyl tak efektivní, jako v předešlých případech, kdy byly k oxidaci 3-ABA použity jaterní mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem a fenobarbitalem. Po třicetiminutové inkubaci je oxidováno okolo 60% 3-ABA. Jako majoritní metabolit se tvoří metabolit M14 s maximem tvorby ve 120 minutách, při delším čase inkubace docházelo k poklesu jeho tvorby. Metabolit M18 byl v tomto případě také tvořen, a jeho přírůstek rostl s časem inkubace. Oxidační metabolit 3-NBA se v tomto mikrosomálním systému tvořil také. V porovnání s mikrosomálním systémem potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem byla ale jeho tvorba o řád nižší (**Obr. 25**).



**Obr. 25** Závislost oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy kontrolního (neindukovaného) potkana na době inkubace. Složení inkubační směsi dle kap. 3.3.5.2. Kontrolou je inkubační směs bez mikrosomů. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

Na obrázku 26 je zobrazena závislost vazby 3-ABA na mikrosomální proteiny na době inkubace reakční směsi po inkubaci 3-ABA kontrolními mikrosomy potkana. Byl pozorován nárůst absorpance proteinových frakcí při 360 nm s dobou inkubace reakční směsi. Specifická vazba aktivovaného 3-ABA je však v tomto mikrosomálním systému o 40-50 % menší, než v případě vazby 3-ABA v jaterních mikrosomálních systémech potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem, a v systému jaterních mikrosomů potkana indukovaného fenobarbitalem.



**Obr. 26** Vazba 3-ABA po jeho aktivaci mikrosomálními systémy kontrolního (neindukovaného) potkana na proteiny. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

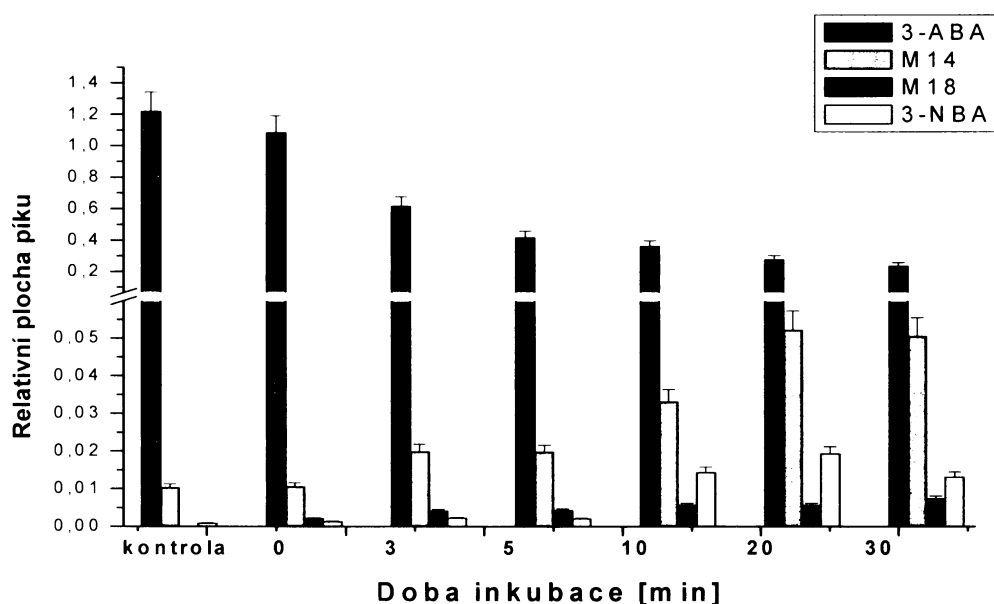
#### 4.1.3 Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana v časovém intervalu do 30 minut inkubace

Z výsledků uvedených v předešlých kapitolách vyplývá, že oxidace 3-ABA je závislá na době inkubace reakční směsi. U všech třech použitých mikrosomálních systémech jsme pozorovali, že dochází k efektivní oxidaci 3-ABA v časovém rozmezí 0 až 30 minut doby inkubace reakční směsi. Zaměřili jsme se proto na analýzu oxidace 3-ABA v rozmezí tohoto časového intervalu, abychom získali detailnější a ucelenější představu o sledované reakci.

Reakční směs byla připravena dle kapitoly 3.3.5.3. Inkubace probíhala za přítupu vzduchu za stálého třepání (400 RPM) na termomixeru eppendorf, při teplotě 37°C po dobu 0, 3, 5, 10, 20, 30 minut.

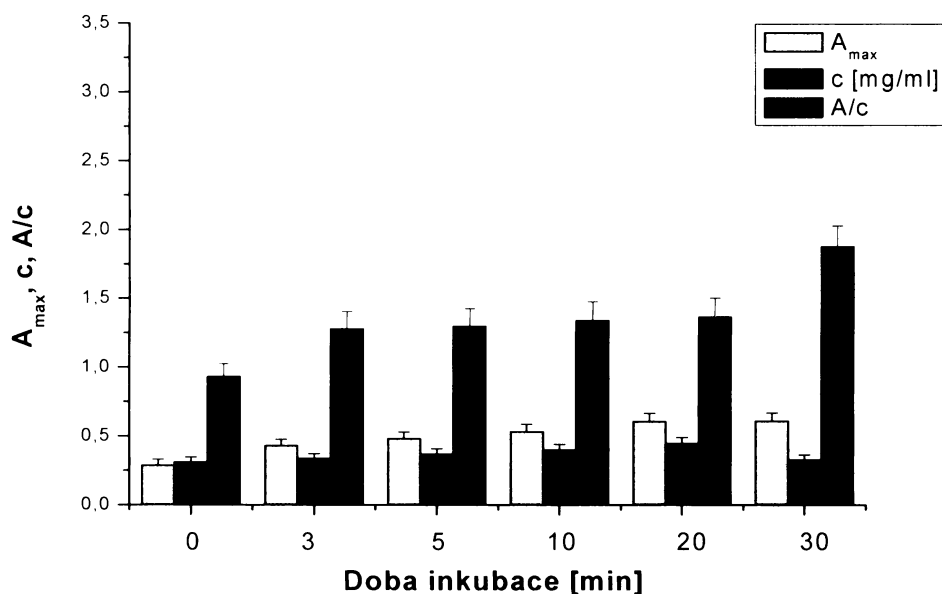
a) *Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem*

Ze získaných výsledků vyplývá, že rychlost oxidace 3-ABA je lineární po dobu inkubace 5 minut, kdy se spotřebovalo 64% 3-ABA (**Obr. 27**). Po delší době inkubace 3-ABA s jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem pak již docházelo k nelineární přeměně 3-ABA. Úbytku 3-ABA koresponduje přírůstek tvorby metabolitu M14, k jehož maximální tvorbě dochází při 20 minutách inkubace. Spolu s metabolitem M14 se tvořily 3-NBA a metabolit M18.



**Obr. 27** Závislost oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem na době inkubace reakční směsi (0 – 30 minut inkubace). Složení inkubační směsi dle kapitoly 3.3.5.3. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

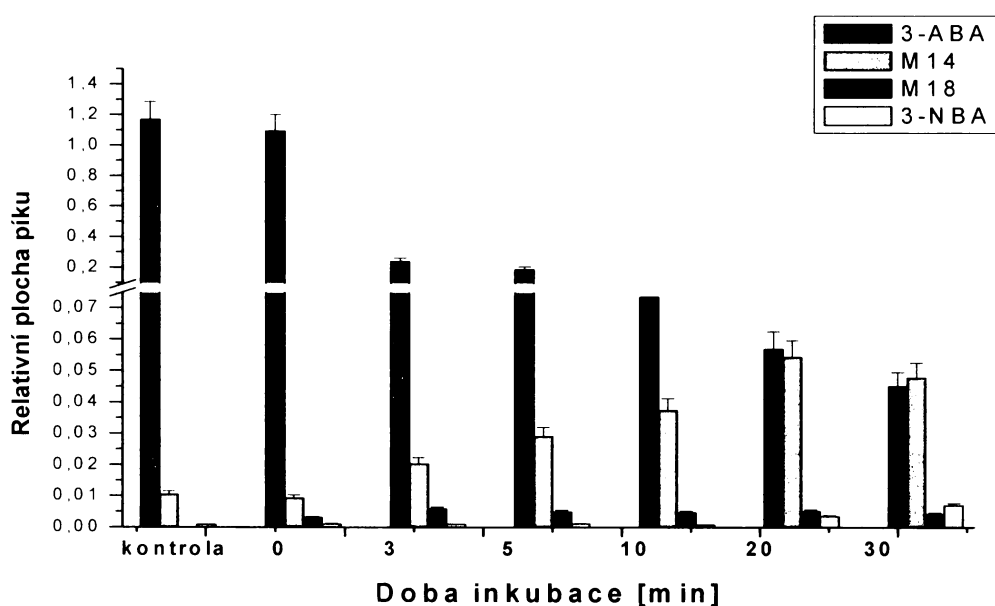
I při této studii jsme sledovali vazbu 3-ABA na mikrosomální proteiny po jeho aktivaci jaterním mikrosomálním systémem potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem (**Obr. 28**). Vazba 3-ABA na proteiny je nižší v porovnání s vazbou sledovanou při delší době aktivace 3-ABA s tímto mikrosomálním systémem (**Obr. 22, str. 54**). Nižší hodnoty vazby 3-ABA na proteiny jsou pochopitelné (kratší doba inkubace 3-ABA s mikrosomálním systémem).



**Obr. 28** Vazba 3-ABA po jeho aktivaci jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem na mikrosomální proteiny (0 – 30 minut inkubace). Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

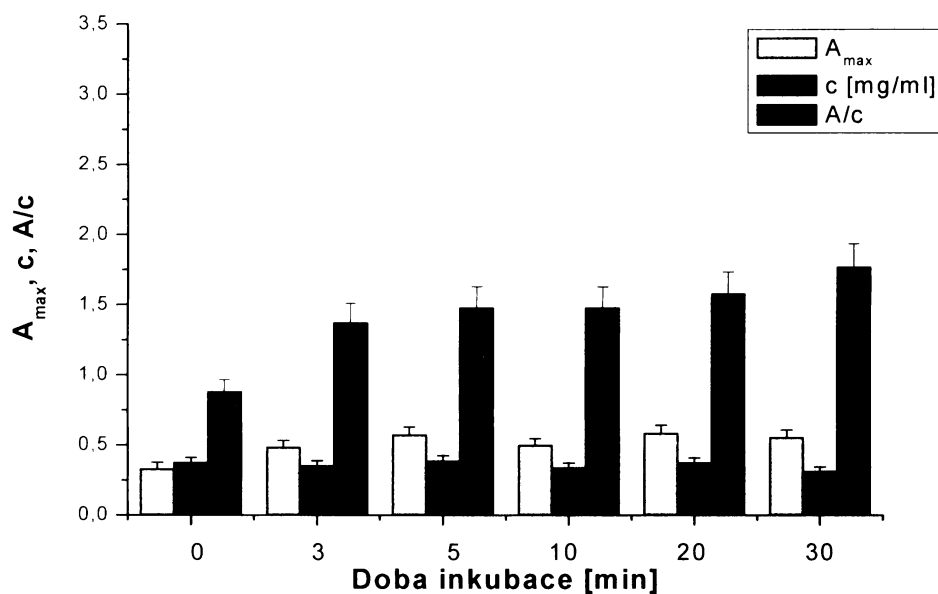
b) *Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem*

Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem vede do doby inkubace 3 minut k přeměně 79 % 3-ABA (**Obr. 29**). Po dalších dvou minutách inkubace pak již bylo přeměněno pouze 5 % 3-ABA. Majoritním metabolitem, který se v tomto systému tvořil byl metabolit M14, jeho tvorba byla lineární do doby inkubace 5 minut a maximum jeho tvorby bylo zaznamenáno při 20 minutách inkubace reakční směsi. Pozvolna stoupala i tvorba metabolitu M18. 3-NBA byl tímto systémem také tvořen, jeho tvorba rostla s časem inkubace. Maximum tvorby 3-NBA bylo zaznamenáno při 30 minutové inkubaci reakční směsi.



**Obr. 29** Závislost oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem na době inkubace (0 – 30 minut inkubace). Složení inkubační směsi dle kapitoly 3.3.5.3. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

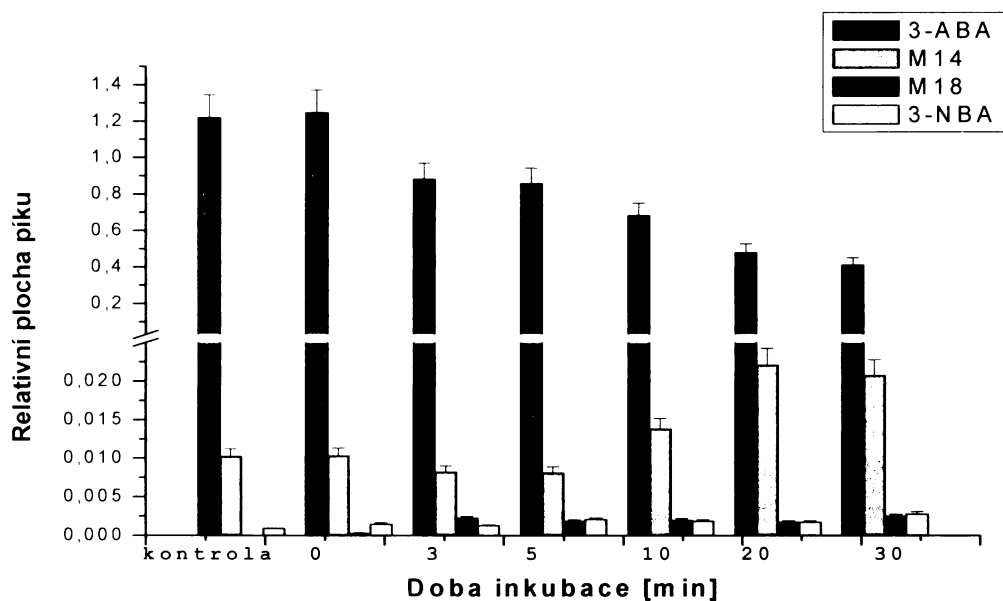
Vazba 3-ABA po jeho aktivaci jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem byla sledována i v této studii (**Obr. 30**). Hodnoty specifických vazeb 3-ABA na proteiny jsou opět nižší v porovnání s hodnotami získanými z delší časové aktivace 3-ABA s tímto mikrosomálním systémem (**Obr. 24, str. 56**).



**Obr. 30** Vazba 3-ABA po jeho aktivaci jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem na mikrosomální proteiny (0 – 30 minut inkubace). Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

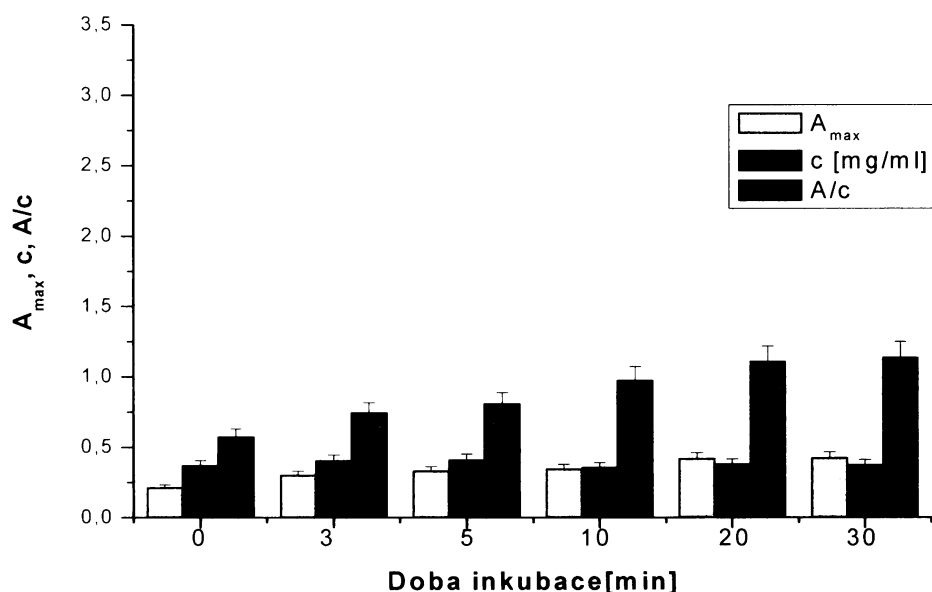
c) Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních (neindukovaných) potkanů

Ze získaných výsledků vyplývá, že oxidace 3-ABA jaterními kontrolními mikrosomy, z nepremedikovaného potkana, (**Obr. 31, str. 63**) má lineární průběh až do 5 minutové inkubace reakční směsi. Při inkubaci do pěti minut se spotřebovalo 30,4 % 3-ABA, což je nejméně ze všech použitých mikrosomálních systémů. Majoritním metabolitem, který se tvořil za použití tohoto mikrosomálního systému byl metabolit M14. Jeho tvorba vykazovala maximum při 20 minutách inkubace reakční směsi. U metabolitu M18 byl zaznamenán pozvolný průběh jeho tvorby. Stejný průběh tvorby byl zaznamenán i v případě 3-NBA. Oba zmíněné metabolity (M18 a 3-NBA) se tvořily v prakticky stejném množství.



**Obr. 31** Závislost oxidace 3-ABA kontrolními jaterními mikrosomy potkana izolovanými z nepremedikovaného potkana (0 – 30 minut inkubace). Složení inkubační směsi dle kapitoly 3.3.5.3. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

Vazba 3-ABA po jeho aktivaci jaterními mikrosomálními systémy z nepremedikovaného potkana na proteiny dosahuje nižších hodnot (**Obr. 32, str. 64**), než v případě jaterních mikrosomálních systémů potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem a fenobarbitalem (**Obr. 28, str. 60 a Obr. 30, str. 62**).



*Obr. 32 Vazba 3-ABA po jeho aktivaci jaterními kontrolními mikrosomy na proteiny (0 – 30 minut inkubace). Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.*

#### 4.1.4 Kinetika oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana v závislosti na koncentraci 3-aminobenzanthronu

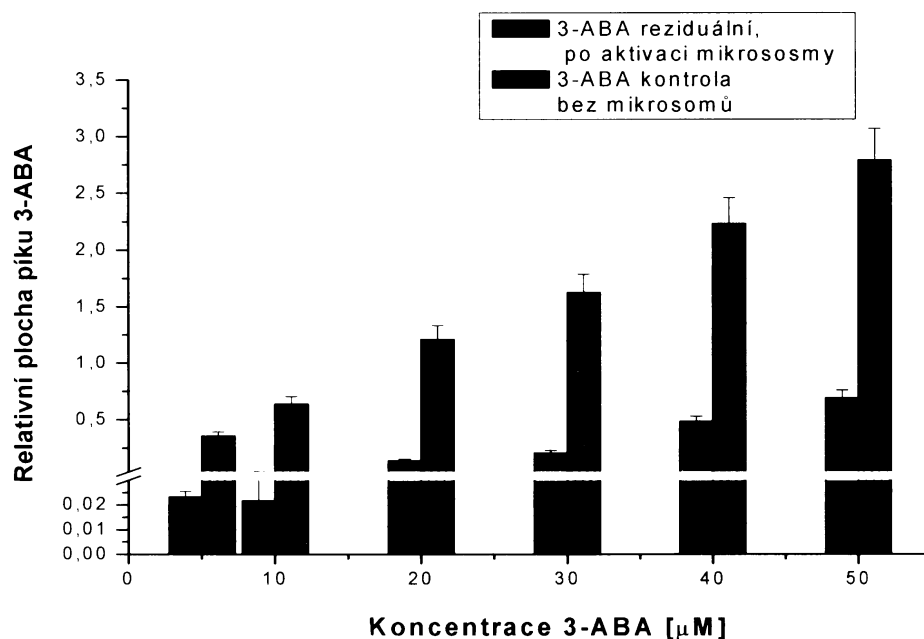
V experimentech sledujících kinetiku oxidace 3-ABA byly použity mikrosomy izolované z laboratorního potkana, a to opět jaterní mikrosomy indukované  $\beta$ -naftoflavonem, jaterní mikrosomy indukované fenobarbitalem a kontrolní jaterní mikrosomy z nepremedikovaných potkanů.

Reakční směs byla připravena dle kapitoly 3.3.5.4 tak, aby obsahovala roztok 3-aminobenzanthronu o výsledných koncentracích 5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{M}$ , doba inkubace reakční směsi byla 5 minut, tedy taková při které je rychlost oxidace 3-ABA v zásadě lineární v závislosti na reakčním čase. Rychlost reakce lze tedy považovat za počáteční rychlost, využitelnou pro kinetické studie.

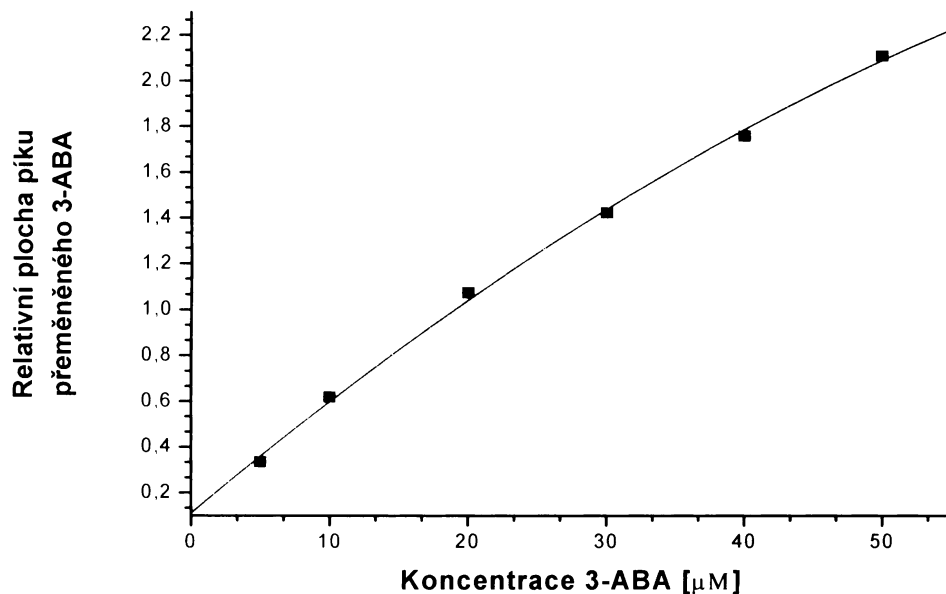


a) *Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem*

Z výsledků ilustrovaných na obrázku 33 je patrné, jak byl 3-ABA oxidován jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem v závislosti na rozdílné koncentraci 3-ABA v reakční směsi. Na obrázku 34, str. 66 je uvedena závislost vyjádřená v množství přeměňovaného (oxidovaného) 3-ABA na koncentraci 3-ABA v reakční směsi. S rostoucí koncentrací 3-ABA rostla i přeměna této sloučeniny.

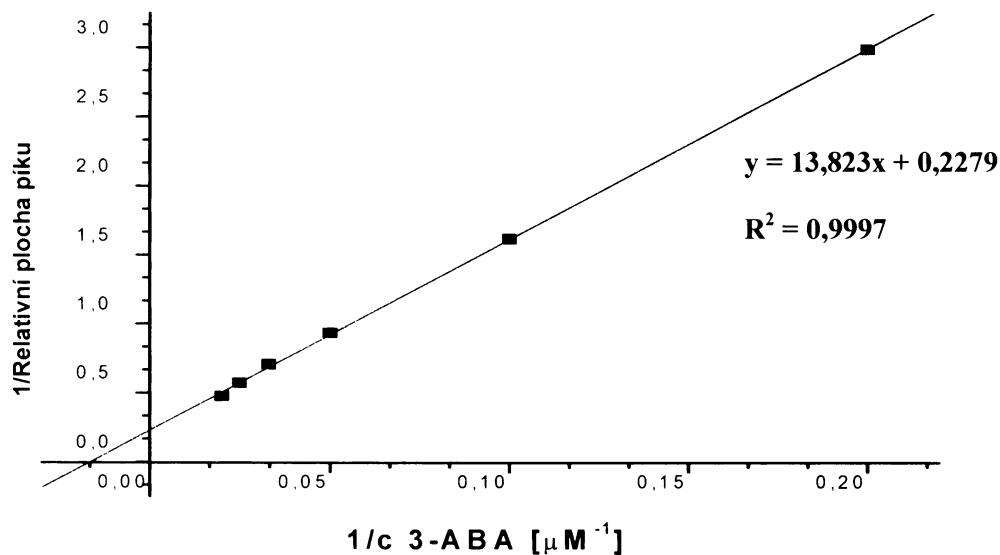


**Obr. 33** *Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem v závislosti na koncentraci 3-ABA v reakční směsi. Složení inkubační směsi dle kapitoly 3.3.5.4. Doba inkubace reakční směsi byla 5 minut. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.*



**Obr. 34** Závislost oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem na koncentraci 3-ABA v reakční směsi.

Ze zjištěných hodnot množství přeměněného 3-ABA byl sestrojen graf dvojnásobného reciprokého vynesení pro zjištění hodnot Michealisovy konstanty  $K_m$  a  $V_{\max}$  (**Obr. 35**).

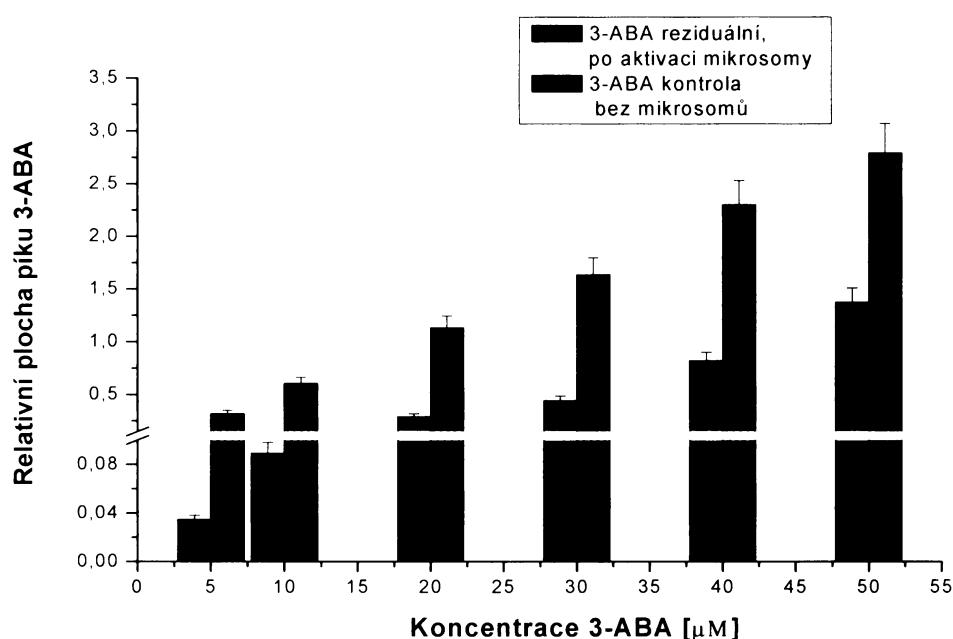


**Obr. 35** Dvojnásobné reciproké vynesení rychlosti oxidace 3-ABA jaterním mikrosomálním systémem potkana, indukovaného fenobarbitalem, na koncentraci 3-ABA v reakční směsi

Michealisova konstanta ( $K_m$ ) pro 3-ABA, oxidovaný jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem, má hodnotu:  $60,7 \mu\text{M}$ , hodnota  $V_{\text{max}}$  je rovna  $19,7 \text{ nmol 3-ABA/min/mg proteinu}$ .

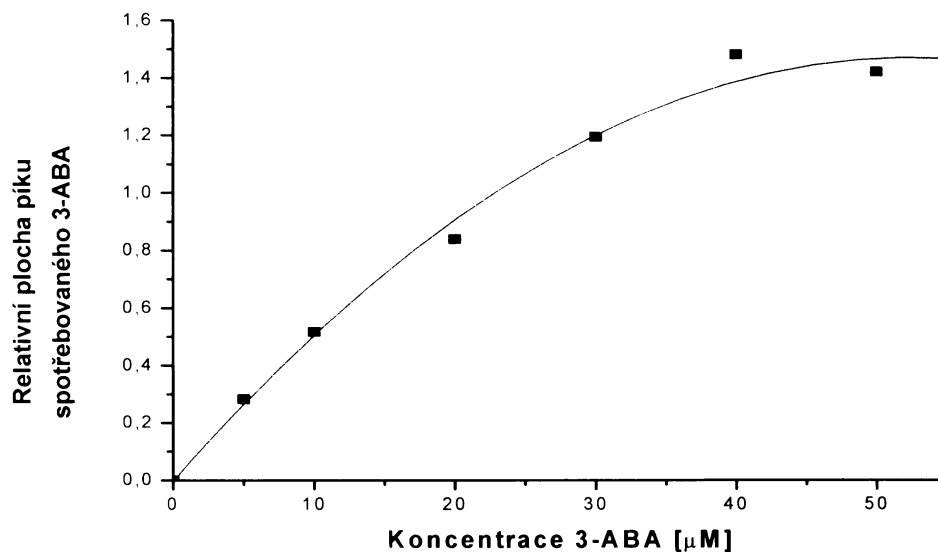
b) *Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem*

Ze získaných výsledků uvedených na obrázku 36 je patrné, jak byl 3-ABA oxidován jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem v závislosti na změně koncentrace 3-ABA v reakční směsi (**Obr. 36**).



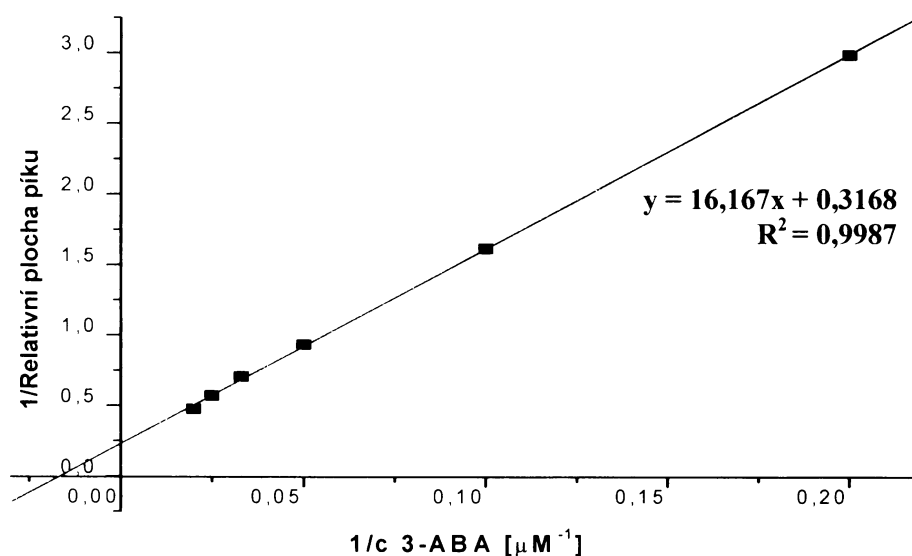
**Obr. 36** Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem v závislosti na koncentraci 3-ABA v reakční směsi. Složení inkubační směsi dle kapitoly 3.3.5.4. Doba inkubace reakční směsi byla 5 minut. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

Závislost rychlosti oxidace 3-ABA na koncentraci 3-ABA v reakční směsi je vyjádřena na obrázku 37. S rostoucí koncentrací 3-ABA v reakční směsi rostla i rychlost oxidace (přeměny) této sloučeniny, se saturací při  $50 \mu\text{M}$  3-ABA v reakční směsi. (**Obr. 37, str. 68**).



**Obr. 37** Závislost oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem na koncentraci 3-ABA v reakční směsi

Hodnota Michealisovy konstanty ( $K_m$ ) a maximální rychlost reakce ( $V_{\max}$ ) byla určena z dvojnásobného reciprokého vynesení rychlosti oxidace 3-ABA na jeho koncentraci v reakční směsi (**Obr. 38**).

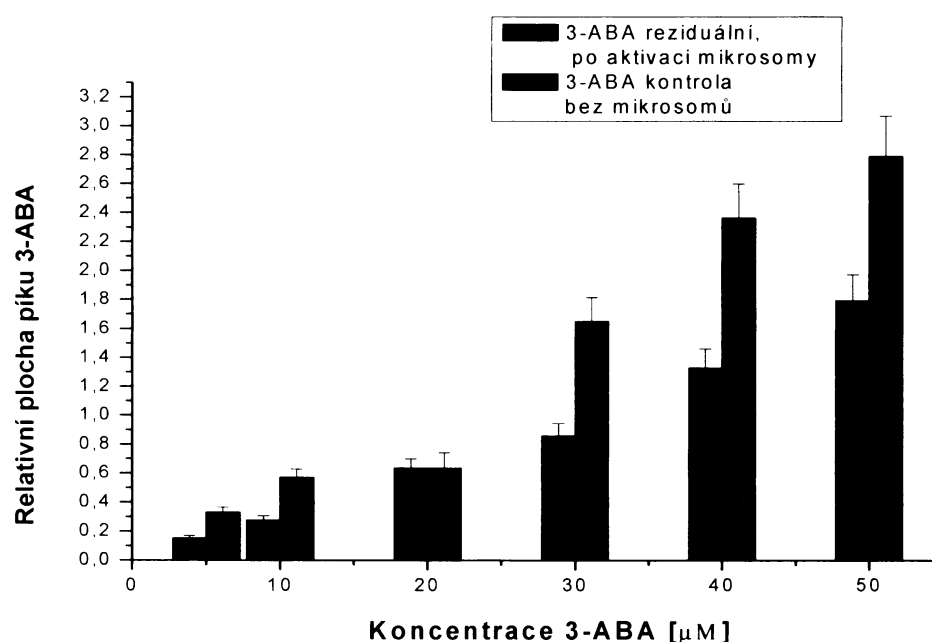


**Obr. 38** Dvojnásobné reciproké vynesení rychlosti oxidace 3-ABA jaterním mikrosomálním systémem potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem na koncentraci 3-ABA v reakční směsi

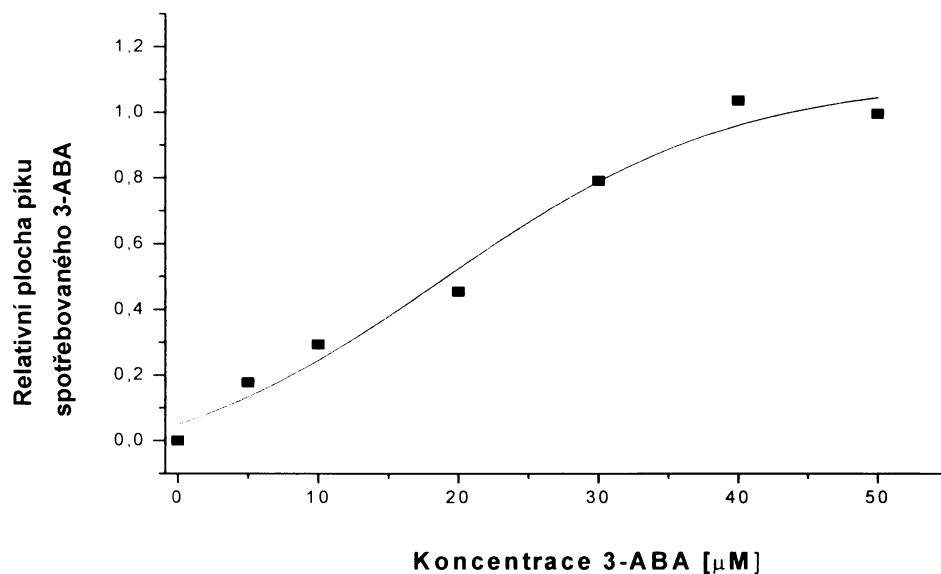
Michealisova konstanta ( $K_m$ ) pro oxidaci 3-ABA, jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem, má hodnotu:  $51,0 \mu\text{M}$  a maximální rychlost reakce oxidace 3-ABA tímto mikrosomálním systémem je rovna  $14,2 \text{ nmol 3-ABA/min/mg}$  proteinu.

c) *Oxidace 3-ABA kontrolními jaterními mikrosomy potkana*

Ze získaných výsledků, uvedených na obrázku 39 vyplývá, jak byl 3-ABA oxidován jaterním mikrosomálním systémem kontrolního (nepremedikovaného) potkana při změně koncentrace 3-ABA v reakční směsi. Byla pozorována podstatně nižší oxidace 3-ABA, než v případě oxidace 3-ABA vysoce účinnými jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem (*Obr. 33, str. 65*).



*Obr. 39* Oxidace 3-ABA jaterními kontrolními mikrosomy potkana v závislosti na koncentraci 3-ABA v reakční směsi. Složení reakční směsi dle kapitoly 3.3.5.4. Doba inkubace reakční směsi byla 5 minut. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.



**Obr. 40** Závislost oxidace 3-ABA jaterními kontrolními mikrosomy potkana na koncentraci 3-ABA v reakční směsi

Na obrázku 40 je zobrazena závislost rychlosti oxidace 3-ABA na koncentraci této sloučeniny v reakční směsi. Závislost vykazuje sigmoidální charakter. K určení  $K_m$  bylo proto nezbytné použít Hillovo vynesení, pro něž platí následující rovnice<sup>(115)</sup>:

$$v_0 = V_{max} \cdot [S]^n / K' + [S]^n \quad [\mu\text{mol}/\text{min}]$$

$V_{max}$  ..... maximální rychlost reakce

$[S]$  ..... koncentrace substrátu

$n$  ..... Hillův koeficient

$v_0$  ..... počáteční rychlost reakce

„Zdánlivá“ Michealisova konstanta  $K'$  pro 3-ABA je rovna hodnotě  $9,5 \mu\text{M}$ , Hillův koeficient ( $n$ ) pak hodnotě  $1,9$ . Hillův koeficient se blíží k hodnotě  $2$ . V současnosti nelze rozhodnout, zda nalezený Hillův koeficient odpovídá kooperativní vazbě 3-ABA na

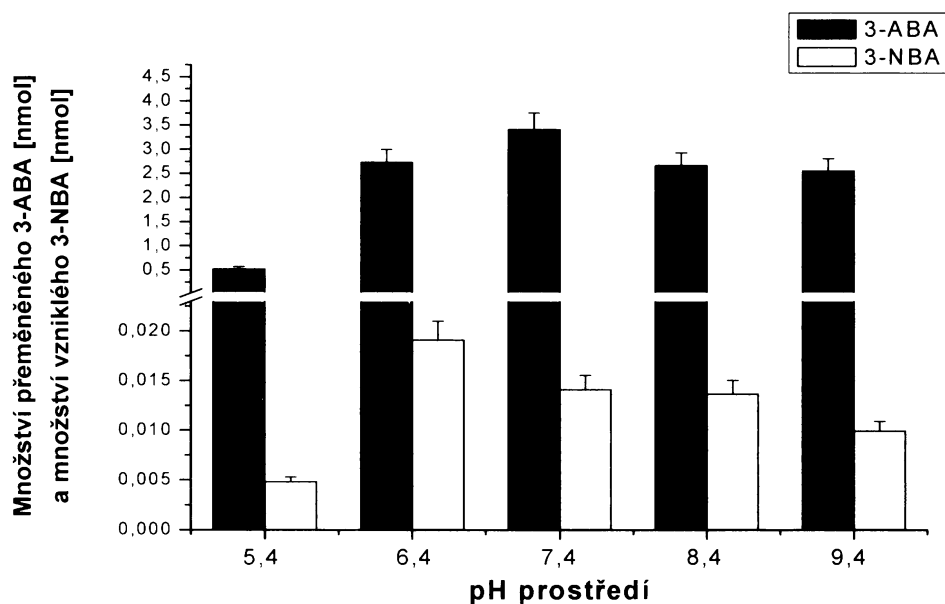
jednom z cytochromů P450 přítomných v použitém mikrosomálním systému nebo jestli je 3-ABA atakováno více mikrosomálních enzymů (cytochromů P450), které ho přeměňují.

#### **4.1.5 Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana v závislosti na změně pH**

V této studii oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem, fenobarbitalem a kontrolními (neindukovanými) mikrosomy jsme se zaměřili na vliv pH prostředí, ve kterém probíhala oxidace 3-ABA. Reakční směs byla připravena jak je uvedeno v kapitole 3.3.5.5, použity byly fosfátové pufrы o pH: 5,4; 6,4; 7,4; 8,4; a 9,4. Inkubace reakční směsi probíhala po dobu 10 minut, koncentrace 3-ABA byla 2 mM.

##### a) *Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného $\beta$ -naftoflavonem v závislosti na změně pH*

Ze získaných výsledků, které jsou zobrazeny na obrázku 41, str. 72 vyplývá, že k největší přeměně 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem docházelo při pH 7,4. Naopak nejmenší přeměna 3-ABA tímto mikrosomálním systémem probíhala při pH 5,4. 3-NBA se nejvíce tvořil při pH 6,4. Nejmenší tvorba tohoto oxidačního metabolitu byla pozorována při pH 5,4.

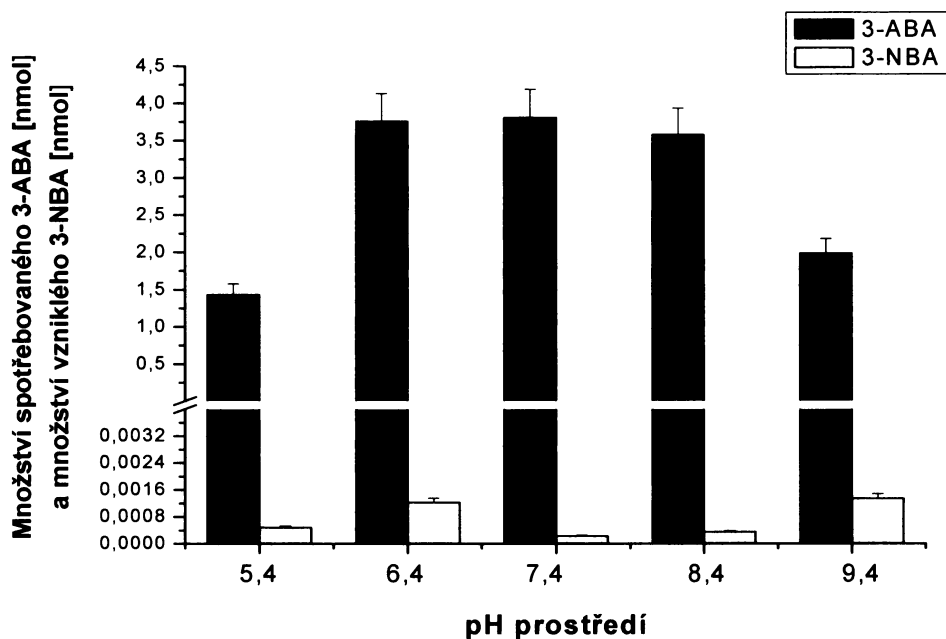


**Obr. 41** Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem v závislosti na změně pH prostředí. Složení inkubační směsi dle kapitoly 3.3.5.5. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

b) Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem v závislosti na změně pH

Ze získaných výsledků závislosti oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana, indukovaného fenobarbitalem na změně pH prostředí vyplývá, že k největší přeměně 3-ABA došlo v rozmezí pH 6,4 – 8,4 (**Obr. 42, str. 73**). K nejmenší přeměně 3-ABA tímto mikrosomálním systémem došlo při pH prostředí 5,4. Nicméně přeměna 3-ABA byla při tomto pH trojnásobná vůči množství oxidovaného 3-ABA jaterními mikrosomy potkana, indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem (**Obr. 41**). Maximální tvorba 3-NBA byla pozorována při pH 6,4.

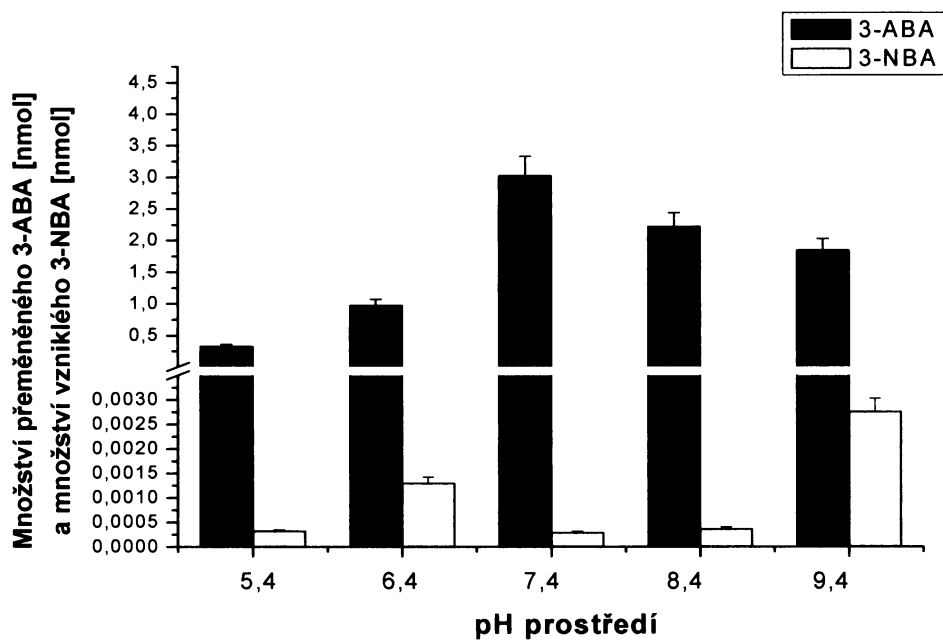




**Obr. 42** Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem v závislosti na změně pH prostředí. Složení inkubační směsi dle kapitoly 3.3.5.5. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

c) Oxidace 3-ABA jaterními kontrolními mikrosomy potkana (z nepremedikovaného potkana) v závislosti na změně pH

Získané výsledky závislosti oxidace 3-ABA jaterními kontrolními mikrosomy potkana jsou zobrazeny na obrázku 43, str. 74. K maximální přeměně 3-ABA tímto mikrosomálním systémem dochází při pH 7,4. Naopak nejnižší přeměna 3-ABA byla pozorována při pH 5,4. Oxidace 3-ABA kontrolními jaterními mikrosomy potkana je, ve srovnání s množstvím přeměněného 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem a  $\beta$ -naftoflavonem, nejméně efektivní. Při pH 7,4 se přeměnilo o 25 % 3-ABA méně než v případě jaterních mikrosomů potkana indukovaného fenobarbitalem. Nejmenší přeměna 3-ABA byla zaznamenána při pH prostředí 5,4. Zajímavé zjištění, které ze současných experimentů ještě nemůžeme vysvětlit, je zjištění, že 3-NBA se nejvíce tvořil při pH 9,4.



**Obr. 43** Oxidace 3-ABA kontrolními mikrosomy potkana v závislosti na změně pH prostředí. Složení inkubační směsi dle kapitoly 3.3.5.5. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

## 5. DISKUSE

V rámci této diplomové práce jsme se zabývali studiem metabolismu aromatického aminu, 3-aminobenzanthronu<sup>(92)</sup>, s cílem rozšířit poznatky o metabolismu této pro člověka potenciálně toxické (karcinogenní) sloučeniny. Je známo, že 3-ABA a jeho parentální sloučenina, karcinogenní 3-NBA, jsou schopné generovat adukty s DNA<sup>(96, 97, 103, 105)</sup> a iniciovat tak patologické procesy v organismu.

Z předcházejících studií je známo, že klíčovým místem metabolické aktivace 3-ABA je aminoskupina, na které dochází k oxidaci na nestabilní a reaktivní N-hydroxy amin (N-OH-ABA). Tento N-hydroxylamin pak tvoří nitreniový ion, který buď sám, nebo přeměněný na karbeniový ion, ochotně reaguje s nukleofilními centry DNA za tvorby aduktů<sup>(96)</sup> (*Obr. 12*). Takto je popsána cesta metabolické aktivace zmíněné sloučeniny pomocí cytochromů P450 1A1 a 1A2<sup>(96)</sup>. Nedávno byla také objevena metabolická aktivace 3-ABA katalyzovaná peroxidasami. Rostlinná křenová peroxidasa, dále hovězí laktoperoxidasa, lidská myeloperoxidasa<sup>(111)</sup> a ovčí COX1 byly použity jako modelové peroxidasy. Adukty s DNA tvořené z 3-ABA těmito enzymy jsou shodné s adukty tvořenými z 3-ABA cytochromy P450 (*Obr. 12*). Mechanismus jejich tvorby však není totožný. V případě peroxidas předpokládáme tvorbu imino-derivátu 3-ABA, ze kterého pak jsou generovány nitreniové a karbeniové ionty.

V předkládané diplomové práci jsme se zaměřili na studium jednak aktivační cesty metabolismu 3-ABA, tak i na možnou detoxikační metabolickou cestu.

Ke studiu metabolismu 3-aminobenzanthronu byly použity jaterní mikrosomální systémy potkana, a to potkana kontrolního, (neindukovaného), dále potkana premedikovaného  $\beta$ -naftoflavonem (frakce „nabohacená“ podrodinou cytochromu P450 1A) a fenobarbitalem (frakce „nabohacená“ podrodinou cytochromu P450 2B).

Bylo zjištěno, že všechny tři mikrosomální systémy, obsahující cytochromy P450, oxidují 3-ABA na 3 metabolity. Na metabolit označený M14, eluovaný při HPLC v čase 14 minut, metabolit označený M18, eluovaný při HPLC v retenčním čase 18 minut, třetím metabolitem byl při HPLC eluovaným v retenčním čase 25 minut 3-nitrobenzanthron (oxidační prekurzor 3-ABA). Struktura metabolitů M14 a M18 nebyla dosud charakterizována. Nicméně lze předpokládat, že se jedná o metabolity, které mohou být

metabolity 3-ABA, oxidované na uhlících aromatických kruhů 3-ABA nebo *N*-OH-ABA. O poslední zmíněné sloučenině však lze předpokládat, že je nestabilní, a tedy obtížně detekovatelná metodami užitými v našich experimentech. Domníváme se tedy, že *N*-OH-ABA není ani metabolitem M14 ani M18.

Oxidace 3-aminobenzanthronu jaterními mikrosomálními systémy byla sledována z několika hledisek. Jedním z hledisek byla časová závislost inkubace 3-ABA s mikrosomálními systémy. Dalším hlediskem, které bylo posuzováno, byla oxidace 3-ABA mikrosomy při změně koncentrace této sloučeniny v reakční směsi. Posledním hlediskem, sledovaným při oxidaci 3-ABA jaterními mikrosomy potkana, byl vliv pH reakčního prostředí na metabolismus 3-ABA.

Bylo zjištěno, že nejvíce efektivním oxidačním systémem 3-ABA jsou jaterní mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem (indukce cytochromů P450 2B). Při použití tohoto systému docházelo k největší přeměně 3-ABA. Majoritně tvořeným metabolitem byl metabolit M14. U tohoto mikrosomálního systému můžeme předpokládat detoxikační metabolickou cestu, a to proto, že za jeho použití sice dochází k velké přeměně 3-ABA, ale k nízké vazbě aktivovaného 3-ABA na DNA<sup>(95, 96, 105)</sup>. To bylo zjištěno v předchozí studii prováděné v naší laboratoři<sup>(96)</sup>.

Této skutečnosti odpovídají i výsledky vyšetřené při studiu modifikace mikrosomálních proteinů v průběhu oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana. Vazba aktivovaného 3-ABA je v jaterních mikrosomech potkana indukovaného fenobarbitalem nižší než v jaterních mikrosomech potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem.

Druhým efektivním systémem byla jaterní mikrosomální frakce potkana, indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem (indukce cytochromu P450 1A1, 1A2). Již dříve bylo zjištěno, že při použití tohoto mikrosomálního systému dochází k aktivaci 3-ABA za efektivní tvorby aduktů s DNA<sup>(95, 96)</sup>.

Kontrolní mikrosomální systém, izolovaný z jater potkana, oxidoval 3-ABA na již zmíněné metabolity, ale s nejmenší účinností. V kinetické studii v tomto systému byly nalezeny kinetiky vykazující sigmoidální kinetické závislosti.

Jak již bylo zmíněno, zabývali jsme se také studiem vazby 3-ABA po jeho aktivaci mikrosomálním systémem na mikrosomální proteiny. Produkty oxidace se mohou podobně jako na DNA<sup>(95, 96)</sup> vázat též na protein. Největší vazbu jsme pozorovali v případě

---

jaterních mikrosomů potkana premedikovaného  $\beta$ -naftoflavonem. Jak již bylo výše uvedeno, tato skutečnost odpovídá aktivační metabolické cestě 3-ABA, na které nejvíce participují cytochromy P450 1A1 a 1A2.

## 6. SHRNU TÍ A ZÁVĚR

Z výsledků uvedených v diplomové práci vyplývá, že se podařilo splnit vytyčené cíle.

Zjistili jsme, že všechny tři jaterní mikrosomální systémy (potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem, fenobarbitalem a kontrolní mikrosomy z neindukovaného potkana) použité v této studii oxidují 3-ABA za vzniku tří metabolitů. Jedním metabolitem je oxidační prekurzor 3-ABA, 3-nitrobenzanthron. Struktura dvou dalších metabolitů M14 a M18 nebyla dosud charakterizována. Jejich charakterizace bude však předmětem dalších studií.

Nejefektivnějším systémem z hlediska oxidace 3-ABA jsou jaterní mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem. V případě tohoto mikrosomálního systému předpokládáme detoxikační metabolickou cestu 3-ABA zprostředkovanou cytochromy P450 podrodiny 2B, které jsou fenobarbitalem indukovány. V tomto systému byly pozorovány nižší hodnoty vazby aktivovaného 3-ABA na mikrosomální proteiny, což podporuje výše zmíněný předpoklad.

Druhým efektivním systémem oxidujícím 3-ABA jsou jaterní mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem. V tomto systému se ale pravděpodobně jedná především o aktivační metabolickou cestu 3-ABA zprostředkovanou cytochromy P450 1A1 a 1A2 indukovanými  $\beta$ -naftoflavonem. Uvedený studovaný systém vykazoval vyšší vazbu aktivovaného 3-ABA na mikrosomální proteiny. Takový jev koreluje s tvorbou aduktů této sloučeniny s DNA.

Všechny uvedené skutečnosti vyzdvihují význam studia této sloučeniny. V dalších studiích bude nutné zabývat se i působení dalších podrodin cytochromu P450 na oxidaci 3-aminobenzanthronu, a tím ucelit představu o jeho metabolismu a genotoxických účincích na člověka.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Thackery E.: *The Gale Encyclopedia of Cancer*, Gale group USA (2002)
2. <http://www.svod.cz/?sec=aktuality&id=24>
3. Stiborová M.: *Kancerogeneze*, přednáška na PřFUK, Praha, katedra biochemie (letní semestr 2005)
4. Weinberg R. A.: *Jediná odrodilá buňka: Jak vzniká rakovina*, Academia, Praha (2003)
5. [www.svod.cz](http://www.svod.cz)
6. <http://onkologie.zdn.cz/detail.htm?id=39551>
7. Vokurka M.: *Praktický slovník medicíny*, Maxdorf, Praha (1994)
8. Rosypal S.: *Úvod do molekulární biologie*, kap. 14, Brno (2002)
9. Bednář B.: *Patologie*, Avicenum, Praha (1982)
10. Stiborová M., Mikšanová M.: *Živa* 4, 146 (1999)
11. Němečková A.: *Lékařská chemie a biochemie*, Avicenum, Praha (1991)
12. Menn J. J.: *Environ. Health Persp.* 27, 113 (1978)
13. IARC: *Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, IARC Monographs 1-42, (7) 224, Lyon (1987)
14. Miller E. C., Miller J. A.: *Cancer* 47, 2327 (1981)
15. Turek B., Hrubý S., Černá M.: *Nutriční toxikologie*, Brno (1994)
16. Večerková J.: *Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi*, skriptum 1. LF UK, Karolinum, Praha (1997)
17. Grimm E., Neumann S., Jacob F.: *Biochem. Physiol. Pflanzen* 180, 383, 257 (1985)
18. Meunier B.: *Biochemie* 69, 3 (1987)
19. Tomatis L., Aitio A., Wilbourn J., Shuker L.: *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 795 (1989)
20. Hodgson E.: *A Textbook of modern Toxicology*, Willey and Son Int., New Jersey (2004)
21. Kasper C. B., Henton D. C., Foureman G. L., Curtis J. F., Hughes H. F.: *Enzymatic basis of detoxification II*, Academic Press. New York (1980)
22. Stiborová M., Schmeiser H. H., Frei E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 857 (1998)

23. Howard P. C., Beland F. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 727 (1982)
24. Djuric Z., Fifer E. K., Yamazoe Y., Beland F. A.: *Carcinogenesis* 9, 357 (1988)
25. Stiborová M., Hájek M., Frei E., Schmeiser H. H.: *Gen. Physiol. Biophys.* 20, 375 (2001)
26. Stiborová M., Frei E., Sopko B., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Carcinogenesis* 23, 617 (2002)
27. Pritsos C. A.: *Chem.- Biol. Interact.* 129, 195 (2000)
28. Ziegler D. M., Pettit F. H.: *Biochem. Biophys Res. Commun.* 15, 188 (1964)
29. Purohit V., Basu A.: *Chem. Res. Toxicol.* 13, 673 (2000)
30. Chae Y., Thomas T., Guengerich F. P., Fu P. P., El-Bayoumy K.: *Cancer Res.* 59, 1473 (1999)
31. Stiborová M.: *Xenobiochemie*, přednáška naPřF UK Praha, katedra biochemie (letní semestr 2005)
32. Stiborová M.: *Chem. Listy* 96, 784 (2002)
33. Coon M. J.: *Nutr. Rev.* 36, 3198 (1978)
34. Gut I., Souček P., Hodek P.: *Pracovní lékařství* 1, 15 (1992)
35. [http://library.thinkquest.org/C004535/endoplasmic\\_reticulum.html](http://library.thinkquest.org/C004535/endoplasmic_reticulum.html)
36. Reid T. M., Morton K. C., Wang C. Y., King C. M.: *Environ. Mutagen.* 6, 705 (1984)
37. Coon M. J., Persson A. V.: *Enzymatic basis of detoxification I*, Academic Press. New York (1980)
38. Heinemann F. S., Ozols J.: *J. Biol. Chem.* 258, 4195 (1983)
39. Taniguchi H., Imai Y., Sato R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 585 (1984)
40. Garfinkel D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493 (1958)
41. Klingenberg M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376 (1958)
42. Omura T., Sato R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370 (1964)
43. Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J. J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C., Nebert D. W.: *Pharmacogenetics* 6, 1 (1996)
44. Nebert D. W., Nelson D. R., Feyereisen R.: *Xenobiotica* 19, 1149 (1989)



45. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem. Listy* 93, 229 (1999)
46. Edwards R. J., Murray B. P., Singleton A. M., Boobis A. R.: *Biochemistry* 30, 71 (1991)
47. Anzenbacher P., Dawson J. H., Kitagawa T.: *J. Mol. Struct.* 214, 149 (1989)
48. Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 243, 811 (1998)
49. <http://www.expasy.ch/>
50. Felsted R. L., En-Yuen Chu A., Chaykin S.: *J. Biol. Chem.* 7, 2580 (1973)
51. Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyereisen R., Gonzales F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O., Okuda K., Nebert D. W.: *DNA Cell Biol.* 12, 1 (1993)
52. <http://www.metallo.scrips.edu/PROMISE/>
53. Hudeček J.: *Hemoproteiny a metaloproteiny*, přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2004)
54. Spatzenegger M., Jaeger W.: *Drug Metab. Rev.* 27, 397 (1995)
55. Nebert D. W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J., Estabrook R. W., Gonzales F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Philips J. R., Sato R., Waterman M. R.: *DNA* 8, 1 (1989)
56. [www.drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html](http://www.drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html)
57. Stiborová M., Hudeček J., Páca J.: *Bull. Čs. Spol. Biochem. Mol. Biol.* 28, 57 (2000)
58. Guengerich F. P.: *Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry*, Plenum Press, Nex York, (1995)
59. Ortiz de Montellano P. R.: *Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry*, Plenum Press, Nex York, (1995)
60. [www.concytec.gob.pe/lecturas/berthou/pdf](http://www.concytec.gob.pe/lecturas/berthou/pdf)
61. Lau P. P., Strobel H. W.: *J. Biol. Chem.* 257, 5257 (1982)
62. Schweikl H., Taylor J. A., Kitareewan S., Linko P., Nagorney D., Goldstein J. A.: *Pharmacogenetics* 3, 239 (1993)

- 
63. Bend J. R., Foureman C. L.: *Mar. Environ. Res.* 14, 405 (1984)
64. Anari M. R., Khan S., Jatoe S. D., O'Brien P. J.: *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 22, 305 (1997)
65. Dahl A. R., Hadley W. M.: *Toxicol. Appl. Pharm.* 67, 200 (1983)
66. Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J.: *Chem. Listy* 98, 876 (2004)
67. Schacter B. A., Nelson E. B., Marver H. S., Masters B. S. S.: *J. Biol. Chem.* 247, 3601 (1972)
68. Kasper C. B.: *J. Biol. Chem.* 246, 577 (1971)
69. Wang M., Roberts L. D., Paschke R., Shea M. T., Masters B. S. S., Kim P. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8411 (1997)
70. Nadler S. G., Strobel H. W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 261, 418 (1988)
71. Tamburini P. P., Schenkman J. B.: *Mol. Pharmacol.* 30, 178 (1986)
72. Vermilion J. L., Ballou D. P., Massey V., Coon M. J.: *J. Biol. Chem.* 256, 266 (1981)
73. Oprian D. D., Coon M. J.: *J. Biol. Chem.* 257, 8935 (1982)
74. [www.uky.edu/pharmacy/ps/porter/CPR.html](http://www.uky.edu/pharmacy/ps/porter/CPR.html)
75. White R.D., Shea D., Collow A. R., Stegeman J. J.: *Biochem Pharmacol.* 53, 1029 (1997)
76. Makovec T., Breskvar, K.: *Arch. Biochem. Biophys.* 357, 310 (1998)
77. Zhang J., Falany, J.L., Xie, X., Falany, C.N.: *Chem. Biol. Interact.* 124, 133 (2000)
78. Ueng T.H., Hwang W.P., Chen R. M., Wang H. W., Kuo M. L., Park S. S., Guengerich F. P.: *J. Toxicol. Environ. Health A.* 54, 509 (1998)
79. Shen A. L., Kasper C.B.: *Handbook of Experimental Pharmacology*, 35 (1993)
80. O'Leary K. A., Li H. C., Ram P. A., McQuiddy P., Waxman D. J., Kasper C. B.: *Mol. Pharmacol.* 52, 46 (1997)
81. Ram P. A., Waxman D. J.: *J. Biol. Chem.* 267, 3294 (1992)

82. Dee A., Carlson G., Smith C., Masters B.S., Waterman M.R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 650 (1985)
83. Marques M. M., Mourato L. L. G., Amorim M. T., Santos M. A, Melchior W. B., Beland, F. A.: *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1266 (1997)
84. <http://www.ilo.org/encyclopaedia/?doc&nd=857300034&nh=0>
85. Debies-Rychter M., Land S. J., King, C. M.: *Cancer Res.* 56, 1517 (1996)
86. Vineis P.: *Envir. Health. Perspect.* 102, Supl. 6, 7 (1994)
87. Kadlubar F. F., Fu P. P., Jung H., Shaikh, A. U., Beland F. A.: *Envir. Health. Perspect.* 87, 233 (1990)
88. Hammons G. J., Guengerich F. P., Weis C. C., Beland F. A., Kadlubar F. F.: *Cancer Res.* 45, 3578 (1985)
89. Poulsen L. L., Masters B. S. S., Ziegler D. M.: *Xenobiotica* 6, 481 (1976)
90. Hein D. W., Ruston T. D., Feruson R. J., Dole, M. A, Gray K.: *Arch. Toxicol.* 68, 129 (1994)
91. Yamazoe Y., Nagata K., Ozawa, S., Gong D. W., Kato R.: *Princess. Takamatsu. Symp.* 23, 154 (1995)
92. Seidel A., Dahman D., Krekeler H., Jacob J.: *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204, 333 (2002)
93. Enya T., Suzuki T., Watanabe T., Hirayama T., Hisamatsu Y.: *Environ. Sci. Technol.* 31, 2772 (1997)
94. Adachi S., Kawanura K., Takemoto K., Suzuki H., Hisamatsu Y.: *Relationship between respiratory disease and exposure to air pollution* (Heinrich U., Dungworth D. L., Brain J. D., Droscoll K. E., Grafstorm R. C., Harris C. C., Mohr U., Eds), ILSI Press, Washington, D.C (2000)
95. Arlt V. M., Stiborova, M., Hewer A., Schmeiser H. H., Phillips D. H.: *Cancer Res.* 63, 2752 (2003)
96. Arlt V. M., Hewer A., Sorg B. L., Schmeiser H. H., Phillips D. H., Stiborova, M.: *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1092 (2004)
97. Arlt V. M., Stiborova M., Henderson C. J., Osborne M. R., Bieler C. A., Frei E., Martinek, V., Sopko B., Wolf C. R., Schmeiser H. H., Phillips D. H.: *Cancer. Res.* 65, 2644 (2005)
98. Bieler C. A., Wiessler M., Erdinger L., Suzuki H., Enya T., Schmeiser H. H.: *Mutant. Res.* 439, 307 (1999)

- 
99. Bieler C. A., Arlt V. M., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Cancer Lett.* 200, 9 (2003)
100. Borlak J., Hansen T., Yuan Z., Sikka H. C., Kumar S., Schmidbauer S., Franh H., Jacob J., Seidel A.: *Polycyclic Arom. Compounds* 21, 73 (2000)
101. Arlt V. M., Bieler C. A., Mier W., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Int. J. Cancer*, 93, 450 (2001)
102. Arlt V. M., Glatt H., Muckel E., Pabel U., Sorg B. L., Schmeiser H. H., Phillips D. H., *Carcinogenesis* 23, 1937 (2002)
103. Arlt V. M., Sorg B. L., Osborne M., Hewer A., Seidel A., Schmeiser H. H., Phillips D.H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 300, 107 (2003)
104. Arlt V. M.: *Mutagenesis* 20 (6), 399 (2005)
105. Arlt V. M., Glatt H. R., Muckel E., Pabel U., Sorg B. L., Seidel A., Frank H., Schmeiser H. H., Phillips D. H.: *Int. J. Cancer*, 105, 583 (2003)
106. Murahashi T., Watanabe T., Otake S., Hatioti Y., Takamura T., Wakabayashi K., Hirayama T.: *J. Chromatogr. A* 992, 101 (2003)
107. Murahashi T., Iwanaga E., Watanabe T., Hirayama T.: *J. Health Sci.* 49, 386 (2003)
108. Watanabe T., Husli T., Takahashi Y., Hirayama T., Wakabayashi K.: *Mutant. Res.* 538, 121(2003)
109. Nagy E., Zeisig M., Kawamura K., Hisamatsu Y., Sugeta A, Adachi S., Moller L.: *Carcinogenesis* 26, 1821 (2005)
110. Arlt V. M., Zhan L., Schmeiser H. H., Honma M., Hayashi M., Phillips D. H., Suzuki T.: *Envir. Mol. Mutagen* 43, 186 (2004)
111. Arlt V. M., Colin J. H., Wolf R. C., Schmeiser H. H., Phillips D. H., Stiborova M.: *Cancer Lett.* 234, 220 (2006)
112. Stiborová M., Frei E., Bieler C. A., Schmeiser H. H.: *Chemické listy* 92, 661 (1998)
113. Lowry O. H., N. J. Rosebrough A. L. Farr and R. J. Randall, 1951.. *J. Biol. Chem.* 193,265 (1951)
114. Lindström-Seppä P., Koivusaari U., Hänninen O.: *Aquatic. Toxicol.* 3, 35 (1983)
115. Hill A. V., *J. Physiol (Lond.)* 40, IV (1910)
116. <http://www.intmtc.com/books.html>

Souhlasím se zapůjčením této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence o vypůjčovatelích

<b>Jméno a příjmení</b>	<b>Adresa</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum výpůjčky</b>	<b>Poznámka</b>